

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Caracterización de las proteínas del virus de la fiebre aftosa
implicadas en respuesta a mutagénesis letal por análogos de
nucleótido**

Tesis Doctoral

Rubén Agudo Torres
Madrid, 2009

Memoria presentada por el Ldo. en Biología Rubén Agudo Torres para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, junio de 2009.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, bajo la codirección del Dr. Esteban Domingo Solans y del Dr. Armando Arias Esteban, con financiación por parte de la Comunidad Autónoma de Madrid (beca del Programa de Formación de Personal Investigador).

Abreviaturas

A	adenosina/adenosina-5'-monofosfato en un molde de RNA
ACM	anticuerpo monoclonal
ADP	adenosina-5'-difosfato
AMP	adenosina-5'-monofosfato
APRT	adenina fosforribosiltransferasa
AK	adenosina kinasa
ATP	adenosina-5'-trifosfato
AZC	5-azacitidina
Br	5-bromouridina /5-bromouridina-5'-monofosfato en un molde de RNA
BrUTP	5-bromouridina-5'-trifosfato
cDNA	DNA copia
C	citosa-monofosfato en un molde de RNA
C-terminal	carboxi-terminal
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCMP	2'-desoxicitidina-5'-monofosfato
DCTD	dCMP deaminasa
DEAE	dietilaminoetil
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
DMSO	dimetil sulfoxido
dNTP	2'-desoxinucleótido-5'-trifosfato
dTDP	2'-desoxitimidina-5'-difosfato
dTMP	2'-desoxitimidina-5'-monofosfato
DTT	ditiotreitól
dTTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
dUMP	2'-desoxiuridina-5'-monofosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E9	echovirus-9
e.c.p.	efecto citopático
EDTA	etilén diamino tetraacetato
F	faradio/5-fluorouridina-5'-monofosfato en un molde de RNA
FA	fiebre aftosa
FdUDP	5-fluorodeoxiuridina-5'-difosfato
FdUMP	5-fluorodeoxiuridina-5'-monofosfato
FdUTP	5-fluorodeoxiuridina-5'-trifosfato
FR	forma replicativa
FU	5-fluorouracilo
FUDP	5-fluorouridina-5'-difosfato
FUMP	5-fluorouridina-5'-monofosfato
FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato
FUr	5-fluorouridina
G	guanosina/guanosina-5'-monofosfato en un molde de RNA

GBV-B	virus GB-B
GDP	guanosina-5'-difosfato
GMP	guanosina-5'-monofosfato
GMPS	GMP sintetasa
GTP	guanosina-5'-trifosfato
GuH	hidrocloruro de guanidino
HGXPR	hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa
h.p.i.	horas post-infección
I	5-iodouridina /5-iodouridina-5'-monofosfato en un molde de RNA
IFN	interferón
IL	interleuquina
IMP	inosín-5'-monofosfato
IMPDH	inosín-monofosfato deshidrogenasa
IPTG	isopropil-β-D-1-thiogalactopiranosido
IUTP	5-iodouridina-5'-trifosfato
IR	intermediario replicativo
K _{0.5,app} [FUTP]	concentración de FUTP necesaria para obtener la mitad de la elongación total de RNA en un ensayo de elongación en presencia de 50 μM UTP
kDa	kilodalton
<i>lacZ</i>	gen que codifica la β-galactosidasa
LB	Luria-Bertani
Mg ²⁺	iones magnesio
Mn ²⁺	iones manganeso
m.d.i.	multiplicidad de infección
MOPS	ácido 3N-morfolín-propil-sulfónico
NPP	nucleósido de purina fosforilasa
N-terminal	amino-terminal
NTP	ribonucleótido-5'-trifosfato
OPRT	ororato fosforribosiltransferasa
OriI	origen de replicación interno
PEI	polietilendiamina
PEG	pegilado
Poli(A)	poliadenilato
Poli(C)	policitidilato
Poli(G)	poliguanidilato
poli-His	polihistidinas
Poli(U)	poliuridilato
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
PPi	pirofosfato
PRPP	fosforribosil pirofosfato
PV	poliovirus
R	ribavirina/ribavirina-5'-monofosfato incorporado en un molde de RNA
RDP	ribavirina-5'-difosfato

RMP	ribavirina-5'-monofosfato
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
RNA _r	ácido ribonucleico ribosómico
RNA _t	ácido ribonucleico de transferencia
RNP	ribonucleoproteína
r.p.m.	revoluciones por minuto
RR	ribonucleótido reductasa
RT	retrotranscriptasa
RTP	ribavirina-5'-trifosfato
SBF	suero bovino fetal
Sn	entropía normalizada de Shannon
s/nt	sustituciones por nucleótido
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
T	2'-deoxitimidina-5'-monofosfato incorporado en un molde de DNA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilenediamina
TP	timidín fosforilasa
TS	timidilato sintasa
U	uracilo/uridina-5'-monofosfato incorporado en un molde de RNA
UMP	uridina-5'-monofosfato
UK	uridín kinasa
UP	uridín fosforilasa
UTP	uridina-5'-trifosfato
VFA	virus de la fiebre aftosa
VHA	virus de la hepatitis A
VHC	virus de la hepatitis C
VIH-1	virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactósido
XMP	xantina-5'-monofosfato

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes términos, acrónimos o abreviaturas fijados en la terminología científica inglesa que, o bien se utilizan indistintamente en castellano, o bien aún no tienen traducción española universalmente aceptada:

BHK	(<i>Baby-Hamster Kidney</i>). Riñón de hamster cachorro
Cap	7-metilguanosa en el extremo 5' del RNA _m
Cre	(<i>Cis acting replication element</i>). Elemento de replicación en <i>cis</i>
DMEM	(<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>). Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	(<i>Desoxiribonucleic Acid</i>). Ácido desoxirribonucleico
<i>Fingers</i>	“dedos”. Subdominio de las RpRd
<i>Fingertips</i>	“punta de los dedos”. Subdominio de las RpRd
<i>Fitness</i>	eficacia biológica relativa de un virus respecto a otro

HAART	(<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>). Terapia antirretroviral altamente activa
HRV	(<i>Human Rhinovirus</i>). Rinovirus humano
IC ₅₀	(<i>Inhibitory Concentration 50</i>). Concentración necesaria para reducir una actividad a la mitad.
IRES	(<i>Internal Ribosome Entry Site</i>). Sitio interno de entrada de ribosomas
<i>m/z</i>	relación masa/carga en función de la cual se separan por espectrofotometría de masas las moléculas ionizados
MALDI-TOF	(<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight</i>). Desorción/Ionización láser asistida por matriz
MPA	(<i>Mycophenolic Acid</i>) Ácido micofenólico
Ni-NTA	(<i>Nickel-Nitrilo-Triacetic Acid</i>). Níquel-Ácido nitriloacético
LC-ESI-IT MS/MS	(<i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation-Ion Trap Tandem Mass</i>)
LCMV	(<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i>). Virus de la coriomeningitis linfocítica
<i>Palm</i>	“palma”. Subdominio de las RpRd
PAGE	(<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>). Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAQ	(<i>Partition Analysis of Quasispecies</i>)
PBS	(<i>Phosphate Buffered Saline</i>). Solución salina tamponada con fosfato
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>). Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	(<i>Protein Data Bank</i>). Banco de datos de proteínas
PFU	(<i>Plaque form unit</i>). Unidad formadora de placa
RdRp	(<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>). polimerasa de RNA dependiente de RNA
RNA	(<i>Ribonucleic Acid</i>). Ácido ribonucleico
RT-PCR	(<i>Retrotranscriptase-PCR</i>). Reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR
SARS	(<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>). Síndrome respiratorio severo agudo
SDS	(<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>). Dodecil sulfato sódico
<i>Shuffling</i>	reacción de PCR utilizando como molde 2 o más DNAs de distinta procedencia.
<i>Shut off</i>	inhibición de la síntesis de proteínas del huésped por la maquinaria viral
<i>Slide-back</i>	deslizamiento hacia atrás de la polimerasa durante la síntesis de RNA
SnRNP	(<i>Small nuclear RNP</i>). RNPs pequeñas nucleares
<i>Splicing</i>	proceso post-transcripcional de corte y empalme de RNA
<i>Stem loop</i>	estructura de ácidos nucleicos con forma de tallo y bucle
SV40	(<i>Simian Virus 40</i>). Virus de simio 40
<i>Sym/sub</i>	<i>symmetrical substrate</i>

<i>Tailing</i>	reacción de adición de A en el extremo del DNA mediante DNA polimerasa <i>Taq</i> .
Th1/2	(T <i>helper</i> 1/2). Linfocitos T cooperadores 1 ó 2
<i>Thumb</i>	“pulgar”. Subdominio de las RdRp
TLC	(<i>Thin Layer Chromatography</i>). Cromatografía en capa fina
UTR	(<i>Untranslated Region</i>). Región genómica no codificante
VSV	(<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>). Virus de la estomatitis vesicular
<i>Western Blot</i>	técnica inmunoenzimática para la detección de proteínas
<i>Wobble</i>	“tambaleante”. Tipo de apareamiento no Watson-Crick entre 2 nucleótidos
<i>wt</i>	(<i>wild-type</i>). Tipo salvaje.

Códigos de una y tres letras de los aminoácidos

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

Índice

	Página
1. Summary.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. Cuasiespecies en virus RNA.....	3
2.1.1. Variabilidad genética de los virus RNA.....	3
2.1.2. Concepto de cuasiespecie viral.....	4
2.1.3. Eficacia biológica relativa o <i>fitness</i> del virus.....	5
2.1.3.1. Concepto de <i>fitness</i>	5
2.1.3.2. Alteraciones en el <i>fitness</i>	5
2.1.3.3. Influencia del espectro de mutantes en la dinámica de cuasiespecies.....	6
2.1.4. Implicaciones biológicas de la estructura en cuasiespecies.....	7
2.2. Catástrofe de error y mutagénesis letal como nueva estrategia antiviral.....	8
2.2.1. Concepto de catástrofe de error.....	8
2.2.2. Evidencias experimentales de la entrada de virus en catástrofe de error....	8
2.2.2.1. Evidencias en cultivos celulares.....	8
2.2.2.2. Evidencias <i>in vivo</i>	9
2.2.2.3. Evidencias experimentales de catástrofe de error obtenidas en nuestro laboratorio.....	10
2.3. El virus de la fiebre aftosa (VFA) como modelo.....	10
2.3.1. La fiebre aftosa.....	10
2.3.2. El virus de la fiebre aftosa.....	11
2.3.2.1 Organización genómica y funcional de VFA.....	11
2.4. Traducción del genoma viral y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral.....	15
2.5. Replicación del genoma del virus de la fiebre aftosa.....	15
2.6. Las polimerasas de ácidos nucleicos.....	15
2.6.1. La polimerasa del virus de la fiebre aftosa.....	16
2.7. Proteína 2C.....	20
2.8. Análogos de nucleósido como agentes antivirales para VFA.....	23
2.8.1. 5-Fluorouracilo.....	23
2.8.1.1. Metabolismo del 5-fluorouracilo.....	24
2.8.1.2. Efectos antivirales del 5-fluorouracilo.....	25
2.8.1.2.1. Mutagenesis inducida por halogenoderivados del uracilo....	26

2.8.2. Ribavirina.....	29
2.8.2.1. Metabolismo de la ribavirina.....	30
2.8.2.2. Efectos antivirales de la ribavirina.....	31
2.8.2.2.1. Inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa.....	32
2.8.2.2.2. Inhibición del <i>capping</i>	33
2.8.2.2.3. Inhibición directa de la polimerasa viral.....	33
2.8.2.2.4. Inmunomodulación.....	33
2.8.2.2.5. Mutagénesis letal.....	34
2.8.2.3. Resistencia a ribavirina.....	35
3.Objetivos.....	39
4. Materiales y Métodos.....	41
4.1. Cultivo de células eucarióticas.....	41
4.2. Virus utilizados.....	41
4.2.1. Variantes de VFA.....	41
4.2.2. Clones infecciosos de VFA.....	42
4.3. Agentes antivirales empleados.....	42
4.4. Infecciones de monocapas de células BHK-21 por el VFA.....	43
4.4.1. Infecciones en medio líquido de células BHK-21 en ausencia de agentes antivirales.....	43
4.4.2. Infecciones en medio líquido de células BHK-21 en presencia de agentes antivirales.....	43
4.4.3. Infecciones en medio semisólido de células BHK-21 (plaqueo) y titulación.....	43
4.5. Extracción del RNA viral.....	44
4.5.1. Extracción del RNA viral total.....	44
4.5.2. Extracción del RNA viral intracelular.....	44
4.6. Obtención de cDNA y amplificación por RT-PCR de RNA vírico.....	44
4.7. Purificación de fragmentos de PCR.....	45
4.8. Secuenciación de DNA.....	47
4.9. Cuantificación de moléculas de RNA vírico mediante RT-PCR a tiempo real.....	47
4.10. Clonaje molecular para el análisis de cuasiespecies de VFA.....	48
4.10.1. Clonaje en pET-28a3Dpol.....	48
4.10.2. Clonaje en pGEM-3Z Vector.....	48
4.10.3. Clonaje en pGEM-T Easy.....	49
4.11. Clonaje molecular para la obtención de un RNA correspondiente a la región	

<i>cre</i> (OriI) de VFA.....	49
4.12. Obtención de clones infecciosos mutantes de VFA.....	50
4.13. Determinación de la eficacia biológica relativa (<i>fitness</i>) de las distintas poblaciones virales estudiadas.....	50
4.13.1. Determinación de la eficacia biológica relativa de las poblaciones virales R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60 con respecto a MARLS.....	52
4.13.2. Determinación de la eficacia biológica relativa de las poblaciones virales mutantes derivadas de clones infecciosos.....	53
4.14. Transcripción de clones infecciosos.....	54
4.15. Transfección de RNA viral procedente de la transcripción de clones infecciosos.....	56
4.15.1. Transfección mediante lipofección.....	56
4.15.2. Transfección mediante electroporación.....	56
4.16. Análisis de la síntesis de proteínas virales mediante marcaje metabólico.....	56
4.17. Determinación de la frecuencia de mutación y la entropía normalizada de Shannon de los espectros de mutantes de las poblaciones virales analizadas.....	57
4.18. Clonaje de la región genómica codificante de 3D de VFA en el vector de expresión pET-28a3Dpol.....	57
4.19. Clonaje de la región genómica codificante de 2C de VFA en el vector de expresión pET-28a.....	59
4.19.1. Construcción del plásmido pET28a-2C.....	59
4.19.2. Construcción del plásmido pET28a-2C(I248T).....	60
4.20. Expresión en <i>E. coli</i> de 2C y 3D recombinantes de VFA.....	61
4.21. Purificación de la proteína 3D de VFA expresada en bacterias.....	61
4.22. Purificación de la proteína 2C de VFA expresada en bacterias.....	62
4.23. Ensayos de actividad de la polimerasa de VFA.....	63
4.23.1. Ensayo de polimerización de poli(U).....	63
4.23.2. Ensayo de polimerización de poli(G).....	64
4.23.3. Ensayo de uridilación del péptido VPg.....	64
4.23.3.1. Determinación de la constantes cinéticas $K_{m,app}$ para el ensayo de uridilación del péptido VPg y $K_{i,app}$ para la inhibición por FUTP.....	65
4.24. Preparación de complejos heteropoliméricos molde-iniciador.....	66
4.24.1. Marcaje en 5' de complejos molde-iniciador con ^{32}P	66
4.24.2. Hibridación de complejos molde-iniciador.....	67
4.25. Ensayos de retardo en gel.....	67
4.26. Ensayos de extensión de moldes heteropoliméricos.....	67
4.27. Detección de la incorporación de ribavirina-5'-trifosfato (RTP) en ensayos de	

síntesis de poli(G).....	69
4.28. Ensayos de actividad de la 2C de VFA.....	70
4.29. Electrotransferencia de proteínas y detección con anticuerpos monoclonales o <i>Western blot</i>	71
4.30. Disoluciones y tampones utilizados.....	72
5. Resultados.....	73
5.1. Caracterización biológica de variantes del virus de la fiebre aftosa adaptadas a replicar en presencia de ribavirina.....	73
5.1.1. Pases seriados de poblaciones del virus de la fiebre aftosa en presencia de concentraciones crecientes de ribavirina.....	73
5.1.2. Efecto de la ribavirina en la producción viral y síntesis de RNA de poblaciones de MARLS tratadas con R.....	74
5.1.3. Análisis molecular de las poblaciones MARLS tratadas con R.....	74
5.1.4. Análisis del espectro de mutantes de las poblaciones MARLS tratadas con R.....	76
5.1.5. Cambios de aminoácido encontrados en las secuencias consenso de las poblaciones tratadas con R.....	78
5.1.6. Las poblaciones R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60 muestran una ventaja selectiva en presencia de R, pero no en su ausencia.....	78
5.1.7. Viabilidad de los clones infecciosos de VFA con mutaciones de adaptación a R.....	80
5.1.8. Los clones infecciosos con polimerasas mutantes presentan una disminución en la cinética de producción de RNA viral.....	81
5.1.9. Los clones infecciosos con polimerasas mutantes presentan generalmente incrementos en la eficacia biológica en presencia de R, pero no en su ausencia.....	81
5.1.10. Concentraciones elevadas de R causan extinción viral de pMT28, pero no del mutante pMT28-3D(3M).....	83
5.1.11. Infectividad específica de las poblaciones Wt y 3M tras pases en presencia o ausencia de R.....	85
5.1.12. Análisis del espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28 y pMT28-3D(3M).....	86
5.1.12.1. Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28 y pMT28-3D(3M).....	87
5.2. Caracterización bioquímica de polimerasas mutantes de VFA seleccionadas	

durante tratamiento con R.....	89
5.2.1. La polimerasa 3D de VFA muestra síntesis <i>de novo</i>	89
5.2.2. Actividad enzimática de las polimerasas 3D, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M).....	90
5.2.3. Afinidad de las polimerasas a un molde heteropolimérico de RNA.....	92
5.2.4. Efecto de las distintas sustituciones estudiadas en la polimerasa de VFA en la incorporación de ribavirina-5'-monofosfato (RMP).....	93
5.2.4.1. Ensayos de extensión en moldes homopoliméricos.....	93
5.2.4.2. Ensayos de extensión en moldes heteropoliméricos.....	94
5.3. Caracterización biológica de un mutante de VFA que presenta resistencia a ribavirina mediante una mutación en 2C.....	101
5.3.1. Análisis de la secuencia consenso de la población R-3Mp10.....	101
5.3.2. Análisis biológico del clon infeccioso con la mutación C5087U en presencia y ausencia de R.....	102
5.3.3. Infectividad de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T) en presencia y ausencia de R.....	103
5.3.4. Análisis de la infectividad específica de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T).....	104
5.3.5. Frecuencia de mutación de una población derivada de pMT28- 2C(I248T) pasada en presencia y ausencia de R.....	105
5.3.5.1. Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T)	106
5.3.6. <i>Fitness</i> relativo debido a la mutación I248T en 2C en el contexto de pMT28-3D(3M).....	107
5.3.7. Frecuencia de mutación de una población derivada de pMT28-3D(4M) pasada en presencia y ausencia de R.....	108
5.3.7.1. Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28-3D(4M)....	109
5.4. Caracterización bioquímica de la actividad NTPasa de 2C de VFA.....	111
5.4.1. Clonaje, expresión, purificación e identificación de 2C de VFA.....	111
5.4.2. Determinación de la actividad ATPasa y GTPasa de 2C de VFA.....	112
5.4.3. Efecto del RNA en la actividad ATPasa y GTPasa de 2C.....	114
5.4.4. Determinación de las constantes cinéticas $K_{d,app}$ y k_{pol} para el ensayo de actividad ATPasa de las enzimas 2C <i>wt</i> y 2C(I248T).....	114
5.4.5. Determinación de las constantes cinéticas $K_{d,app}$ y k_{pol} para el ensayo de actividad GTPasa de las enzimas 2C <i>wt</i> y 2C(I248T).....	116
5.4.6. Determinación de las constantes cinéticas $K_{d,app}$ y k_{pol} para el ensayo de	

actividad ATPasa de las enzimas 2C <i>wt</i> y 2C(I248T) en presencia de Mn^{2+}	118
5.4.7. Inhibición de la actividad ATPasa de 2C y 2C(I248T) por ribavirina-5'-trifosfato.....	119
5.4.8. Inhibición de la actividad ATPasa de 2C y 2C(I248T) por hidrocloreuro de guanidinio.....	121
5.5. Caracterización bioquímica y estructural del complejo 3D-VPg implicado en el inicio de la replicación.....	124
5.6. Caracterización molecular de la actividad antiviral de 5-fluorouridina-5'-trifosfato para el virus de la fiebre aftosa.....	127
5.6.1. Inhibición de la replicación de VFA por 5-fluorouracilo.....	127
5.6.2. Inhibición de la uridilación de VPg por FUTP.....	131
5.6.3. Determinación del tipo de inhibición causado por FUTP en el ensayo de uridilación de VPg <i>in vitro</i>	133
5.6.4. Inhibición de la uridilación de VPg por FUTP en condiciones fisiológicas.....	133
5.6.5. Detección del complejo VPg-FUMP por espectrometría de masas.....	135
5.6.6. FUMP se incorpora por la 3D de VFA durante la síntesis <i>in vitro</i> de RNA.....	135
5.6.7. Determinación de la incorporación relativa de FUTP respecto a UTP.....	136
5.6.8. Incorporación de nucleótidos frente a FUMP como molde.....	138
5.6.9. Cinética de incorporación incorrecta de GTP frente a U y FU.....	138
5.6.10. Comparación de la inhibición de la síntesis de RNA por FUTP utilizando VPg u oligo(dT) ₁₅	140
5.6.11. Estudio de la inhibición de la uridilación de VPg <i>in vitro</i> por otros halogenoderivados de UTP.....	141
6. Discusión.....	143
6.1. El estudio de las cuasiespecies apoya la mutagénesis letal como terapia antiviral	143
6.2. La replicación con concentraciones crecientes de ribavirina conduce a la continua adaptación del VFA a la droga.....	144
6.3. El espectro de mutantes indica que RMP se incorpora específicamente frente a C en el genoma del VFA.....	145
6.4. La adaptación de VFA en presencia de R es específica para esta droga y conlleva un coste en la eficacia biológica del virus.....	145
6.4.1. Mutaciones en 3D contribuyen a la resistencia del VFA a R.....	146
6.5. Análisis bioquímico del mecanismo de resistencia a ribavirina en polimerasas de VFA.....	147

6.6. La polimerasa de VFA tiene varios mecanismos para modular la respuesta a R..	149
6.6.1. La sustitución P44S en 3D favorece la aparición de transiciones U→C y A→G.....	151
6.7. El virus que codifica la polimerasa 3D(3M) es resistente a la extinción mediada por R.....	153
6.8. La proteína 2C está implicada en la resistencia de VFA a R.....	154
6.8.1. El análisis bioquímico de 2C confirma los resultados obtenidos en cultivos celulares.....	155
6.8.2. Posible mecanismo de acción de 2C.....	156
6.8.3. Posibles causas del origen de la sustitución I248T en 2C.....	157
6.9. Los datos bioquímicos explican la acción antiviral ejercida por 5-fluorouracilo para VFA en cultivos celulares.....	160
6.10. Perspectivas y futuro de la catástrofe de error como estrategia antiviral.....	161
7. Conclusiones.....	163
8. Bibliografía.....	165
9. Anexo.....	193

1. Summary

1 Summary

RNA virus populations are complex distributions of closely related but non-identical variant genomes termed quasispecies. The large heterogeneity in quasispecies is due to the low fidelity of viral RNA polymerases and the lack of error-repair activities during replication. Studies on genome replication with high error rates predict the existence of an error threshold above which the maintenance of the genetic information would not be possible. The violation of this threshold by increasing the error rate is termed entry into error catastrophe. This fact opens interesting possibilities for the design of a new antiviral compounds with mutagenic properties. The main objective of this Ph. D. Thesis is to define and characterize the viral determinants that play a role either in sensitivity or in resistance of viruses to mutagenic agents, in the context of the quasispecies dynamics.

Ribavirin (R) and 5-fluorouracil (FU) are mutagenic for foot-and-mouth disease virus (FMDV). We have characterized biochemically the inhibitory effect 5-fluorouridine-5'-triphosphate (FUTP) in VPg uridylylation, the first step of FMDV replication, and its mutagenic effect during RNA polymerization. The evolution of FMDV in the presence of increasing concentrations of R resulted in selection of FMDVs with substitutions P169S and P44S in the polymerase (3D). These substitutions together with M296I in 3D conferred FMDV a replicative advantage in the presence of R, but not in the absence of R. *In vitro* studies with purified polymerases have shown that these 3D substitutions confer a decreased capacity to use ribavirin-5'-triphosphate (RTP) as substrate, as compared with the wild type (*wt*) enzyme, and substitution P44S decreased specifically the incorporation of RTP opposite to C. A FMDV encoding 3D with the 3 substitutions was resistant to extinction by R, in comparison with *wt* FMDV. The analysis of the resistant virus genome confirmed the selection of a new amino acid substitution I248T in 2C, that is also involved in the survival of FMDV in the presence of R. Resistance to extinction was associated with a modified pattern of transition mutations, contributed by 2C or 3D. We have expressed and purified the FMDV 2C, and studied the requirements for its NTPase activity *in vitro*. RTP is an inhibitor of the NTPase of 2C. Substitution I248T in 2C confers resistance to the inhibition of the NTPase activity by RTP. These results document that a non-structural protein can modulate mutagen resistance and polymerase fidelity.

2. Introducción

2 Introducción

2.1 Cuasiespecies en virus RNA

2.1.1 Variabilidad genética de los virus RNA

Los virus con genoma RNA son los más abundantes en la biosfera, constituyendo más del 70% de los virus patógenos que infectan organismos superiores. Son los causantes de un gran número de enfermedades en el hombre como gripe, sarampión, varias formas de hepatitis, poliomielitis, SIDA, enfermedades de gran importancia veterinaria como la fiebre aftosa (FA), y otras denominadas “emergentes” como las fiebres hemorrágicas asociadas a hantavirus, arenavirus o filovirus (Duarte et al., 1994b, Morse, 1994, Murphy, 1994, Murphy & Nathanson, 1994, Nichol et al., 1993, Weaver et al., 1994), el síndrome respiratorio agudo severo asociado a coronavirus (Drosten et al., 2003, Ksiazek et al., 2003, Peiris et al., 2003), o la gripe aviar causada por orthomyxovirus (de Jong et al., 1997).

Los virus RNA se caracterizan por tener una elevada variabilidad genética debida a varios factores:

i) Altas tasas de error durante la replicación debido a la baja fidelidad de copia y ausencia de actividad correctora de errores de las RNA polimerasas (Batschelet et al., 1976, Drake, 1993, Drake & Holland, 1999). Los valores de tasa de mutación para los procesos normales de replicación de DNA se han estimado en 10^{-8} a 10^{-11} errores por nucleótido copiado (Drake, 1991, Echols & Goodman, 1991, Kunkel & Alexander, 1986), un valor muy inferior a los 10^{-3} a 10^{-5} errores por nucleótido copiado durante la replicación de virus RNA (Batschelet et al., 1976, Domingo, 2007, Drake & Holland, 1999). Esta elevada tasa de error se debe en parte a la ausencia de actividad correctora de errores de las replicasas de RNA (actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$), presente en varias DNA polimerasas celulares (Bernad et al., 1989). La ausencia de esta actividad en RNA replicasas ha sido documentada tanto por métodos bioquímicos (Coffin et al., 1997, Steinhauer et al., 1992) como estructurales (Bressanelli et al., 1999, Ferrer-Orta et al., 2006b, Hansen et al., 1997, Kohlstaedt et al., 1992).

ii) Procesos de recombinación en virus de genoma no segmentado (especialmente en virus RNA de polaridad positiva) (Agol, 2006, Simmons et al., 2006) proporcionan a los virus RNA un mecanismo adaptativo adicional a las altas tasas de mutación (Domingo, 2007, Domingo et al., 2008, Mikkelsen & Pedersen, 2000).

iii) Los reordenamientos génicos en virus de genoma segmentado. El reordenamiento de segmentos procedentes de diferentes cepas del virus de la gripe ha sido la causa de las grandes epidemias de esta enfermedad a lo largo del siglo XX (Webster, 1999).

iv) Ausencia de mecanismos celulares de reparación post-replicativa que actúan sobre DNA de doble banda pero no sobre híbridos RNA-DNA o intermediarios replicativos de RNA bicatenarios (Friedberg et al., 2006).

2.1.2 Concepto de cuasiespecie viral

Como consecuencia de su elevada variabilidad genética, las poblaciones de virus RNA son distribuciones dinámicas complejas de mutantes diferentes aunque estrechamente relacionados entre sí, sometidos a un continuo proceso de variación genética, competición y selección génica, denominadas cuasiespecies virales (**Figura 2.1**). El concepto teórico de cuasiespecies fue propuesto inicialmente por Eigen, Schuster y sus colaboradores como un nuevo modelo de evolución molecular para describir la estructura poblacional y adaptabilidad de replicones primitivos (Biebricher & Eigen, 2006, Eigen, 1971, Eigen et al., 1988, Eigen & Schuster, 1979). Las primeras demostraciones de la organización en cuasiespecies de virus RNA fueron la del fago Q β , la del virus de la fiebre aftosa (VFA) y la del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Domingo et al., 1980, Domingo et al., 1978, Holland et al., 1982, Sobrino et al., 1983). Hasta el momento, los virus RNA examinados a nivel poblacional muestran un complejo espectro de mutantes y evolucionan tal como predice la dinámica de cuasiespecies (Domingo, 2006, Domingo, 2007, Domingo et al., 2001, Domingo et al., 2003, Figlerowicz et al., 2003). Se han descrito casos de virus DNA que parecen también tener un comportamiento de cuasiespecies al igual que los virus RNA (Ge et al., 2007, Isnard et al., 1998, López-Bueno et al., 2006).

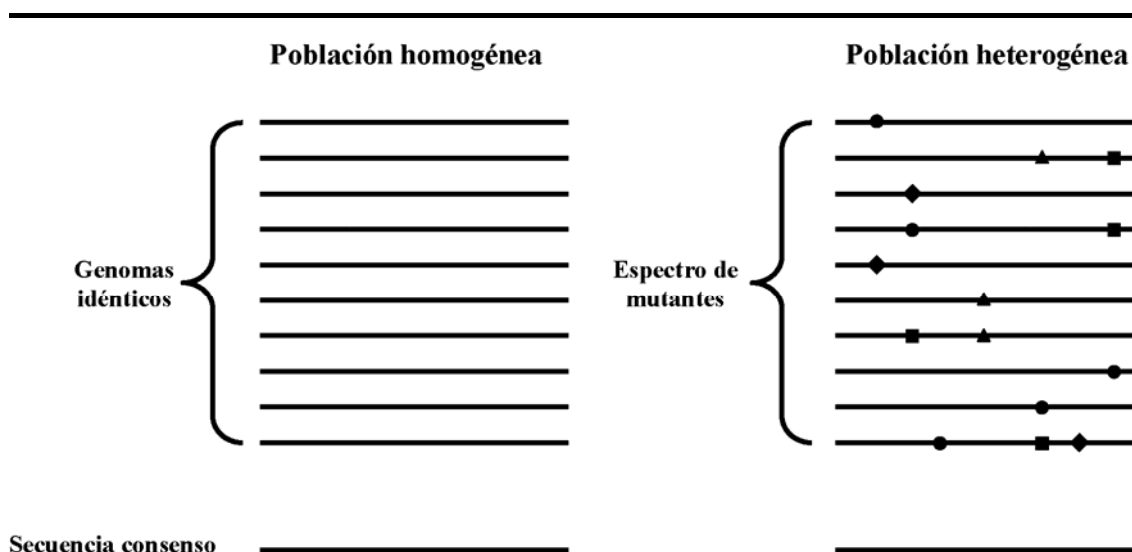


Figura 2.1 Esquema de una población homogénea y una población heterogénea con estructura de cuasiespecie. Cada una de las líneas horizontales representa un genoma de la población, los símbolos ■, ◆, ● y ▲ sobre las líneas representan una mutación en el genoma. Debajo del conjunto de genomas se indica la secuencia consenso o promedio de la distribución.

Las cuasiespecies virales están definidas por una secuencia consenso y un espectro de mutantes (**Figura 2.1**). La secuencia consenso es el promedio de todos los genomas de la población y el espectro de mutantes es el conjunto de genomas que componen la población viral. Debido a la gran heterogeneidad de la cuasiespecie, la secuencia consenso puede no estar

representada en el espectro de mutantes de la población. Las cuasiespecies estables suelen estar dominadas por una secuencia más frecuente en el espectro de mutantes, de mayor eficacia biológica, que se denomina secuencia maestra y que puede o no coincidir con la secuencia consenso (Biebricher & Eigen, 2006).

La evolución de las cuasiespecies víricas está dirigida por la selección positiva, que promueve la imposición de los variantes más ventajosos para un determinado entorno, por la selección negativa, que elimina o mantiene en baja proporción los mutantes menos aptos de la población, y por efectos de deriva genética, por los que un variante puede ser amplificado y llegar a ser dominante, independientemente de su eficacia biológica (Domingo, 2006, Domingo & Holland, 1994, Escarmís et al., 2008).

2.1.3 Eficacia biológica relativa o *fitness* del virus

2.1.3.1 Concepto de *fitness*

Se denomina eficacia biológica o *fitness* de un virus RNA a la capacidad de este virus para producir progenie infecciosa en un determinado ambiente (Domingo & Holland, 1997, Domingo et al., 2003, Holland et al., 1991, Martínez et al., 1991, Quiñones-Mateu & Arts, 2006). Esta aproximación permite establecer valores de eficacia biológica relativa realizando experimentos de competición mediante infecciones con mezclas de dos virus que se distinguen fenotípica o genotípicamente. El valor de eficacia biológica siempre es relativo a un virus de referencia y a un contexto ambiental específico.

2.1.3.2 Alteraciones en el *fitness*

Un factor determinante en la ganancia o pérdida de eficacia biológica de una cuasiespecie es el tamaño de la población viral replicante [(Arias et al., 2004, Baranowski et al., 1998, Chao, 1990, Duarte et al., 1992, Elena et al., 1996, Escarmís et al., 1996, Escarmís et al., 1999, Novella et al., 1995a, Novella et al., 1995b, Sevilla et al., 1998, Yuste et al., 1999), revisión en (Domingo et al., 2003, Escarmís et al., 2006)]. Durante las infecciones con elevado tamaño poblacional, la selección positiva de los variantes más eficaces que se generan durante la replicación permite la ganancia de eficacia biológica (Escarmís et al., 1999, Novella et al., 1995a). Cuando el tamaño poblacional de los virus que participan en la siguiente ronda de replicación es muy reducido, se produce la amplificación de subpoblaciones de genomas independientemente de su adaptación o ventaja selectiva en el entorno. Este fenómeno limita la selección positiva de variantes con mayor eficacia biológica y reduce la posibilidad de que se eliminen variantes menos aptos por selección negativa. Ello permite la fijación de mutaciones deletéreas en la secuencia consenso de la población viral resultante y ocasiona así descensos en la eficacia biológica. Este proceso se conoce como trinquete de Muller (Muller, 1964), y establece que en organismos asexuales se producirán pérdidas en la eficacia biológica como resultado de la acumulación de mutaciones deletéreas cuando los mecanismos compensatorios, como el sexo o la recombinación, estén impedidos (**Figura 2.2**).

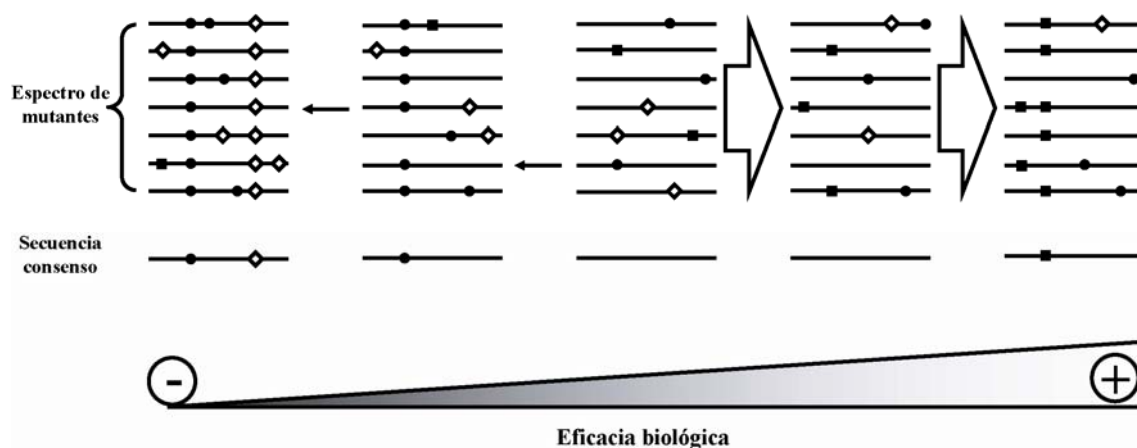


Figura 2.2 Influencia del tamaño poblacional en la eficacia biológica de las poblaciones virales. Se representa en el centro una cuasiespecie que puede ganar eficacia biológica como consecuencia de un proceso de competición y selección génica al ser sometida a replicación con grandes tamaños poblacionales (flechas anchas), o perder eficacia biológica como consecuencia de la fijación al azar de mutaciones en la secuencia consenso al ser sometida a cuellos de botella poblacionales sucesivos (flechas pequeñas). Las líneas representan genomas virales y los símbolos sobre las líneas representan mutaciones. (■) representa las mutaciones ventajosas, (◇) representa mutaciones deletéreas y (●) representa mutaciones neutrales. Las secuencias consenso se representa debajo de los correspondientes espectros de mutantes.

Otro mecanismo por el cual las poblaciones virales pierden eficacia biológica y se acercan a la extinción es el aumento en la frecuencia de mutación durante la replicación mediante el uso de agentes mutagénicos. Este concepto se denomina mutagénesis letal y se detalla en el apartado 2.2.

2.1.3.3 Influencia del espectro de mutantes en la dinámica de cuasiespecies

Los clones biológicos aislados a partir de una cuasiespecie suelen presentar un valor de *fitness* inferior al de la cuasiespecie en su conjunto (Domingo et al., 1978, Duarte et al., 1994a). La eficacia biológica de una cuasiespecie no es la eficacia media de sus componentes, sino que la población viral en su conjunto se comporta como una unidad de selección. Ello ha sido documentado con distintos sistemas experimentales, tanto en cultivo celulares como *in vivo*, que han apoyado las predicciones teóricas sobre la importancia del espectro de mutantes para determinar las propiedades biológicas de los virus (Baranowski et al., 2000, Borrego et al., 1993, Domingo et al., 2001, Eigen, 1993, Eigen & Biebricher, 1988, Miller & Larder, 2001, Pariente et al., 2003, Perales et al., 2007, Pfeiffer & Kirkegaard, 2003, Pfeiffer & Kirkegaard, 2005a, Ruiz-Jarabo et al., 2000, Sanz-Ramos et al., 2008, Vignuzzi et al., 2006).

2.1.4 Implicaciones biológicas de la estructura en cuasiespecies

Las cuasiespecies víricas representan importantes reservorios de variantes, tanto por su cantidad en el espectro de mutantes de la población, como por el potencial para generar nuevos mutantes durante la replicación viral. Esta característica de la estructura en cuasiespecies fue destacada tanto en los estudios teóricos iniciales (Eigen, 1971, Eigen & Schuster, 1979) como en las primeras descripciones de los virus como cuasiespecies (Domingo et al., 1988, Domingo et al., 1985, Wimmer et al., 1993). De este modo, la alta tasa de error proporciona a los virus RNA un poderoso mecanismo para evadir situaciones ambientales adversas, como son la respuesta inmune, o presencia de agentes antivirales, entre otras.

La rápida evolución antigénica de los virus RNA obliga a la actualización de vacunas para prevenir la enfermedad causada por sucesivas variantes virales (Domingo et al., 1997, Lemon, 1997a, Lemon, 1997b, Webster et al., 1982).

Las mutaciones asociadas a resistencia a agentes antivirales se generan como componentes del espectro de mutantes y pueden convertirse en dominantes en presencia del agente inhibidor, como ha sido descrito en numerosos casos (Arnold et al., 2005, Miller & Larder, 2001, Mosser et al., 1994, Pariente et al., 2003, Pfeiffer & Kirkegaard, 2003). Un ejemplo claro es la creciente dominancia de mutantes del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) resistentes (o con menor sensibilidad) a inhibidores antirretrovirales (Coffin, 1995, Domingo et al., 2001, Larder, 1994, Richman, 1994). Estos mutantes preexisten en la población, incluso antes de la exposición al inhibidor (Coffin, 1995, Nájera et al., 1995). Para tratar de contrarrestar la capacidad del VIH-1 de generar mutantes resistentes a inhibidores, se están empleando en la actualidad terapias combinadas, como la terapia antiviral altamente activa (HAART) (Furtado et al., 1999, Ho, 1995, Rezende & Prasad, 2004). Las cuasiespecies víricas pueden también incluir variantes capaces de escapar a células T citotóxicas o a anticuerpos monoclonales neutralizantes (Baranowski et al., 2003, Borrego et al., 1995, Borrego et al., 1993, Mateu, 1995, Parry et al., 1990).

Otro ejemplo de la flexibilidad biológica que confieren las altas tasas de mutación y los complejos espectros de mutantes de las cuasiespecies víricas se manifiesta en la capacidad de adaptación a diferentes tipos celulares mediante el uso de receptores alternativos, [revisado en (Baranowski et al., 2001, Baranowski et al., 2003)]. En otros casos la afinidad de un virus por su receptor se altera por cambios de aminoácido en una proteína de superficie del virus, como se ha descrito para el virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV) (Ahmed et al., 1991, Borrow et al., 1995, Cao et al., 1998, Kunz et al., 2001, Matloubian et al., 1993, Sevilla et al., 2000) o el virus de la gripe (Tumpey et al., 2007).

Las alteraciones del tropismo celular pueden contribuir a modificar la patogenia viral (Bae & Yoon, 1993, Escarmís et al., 1998, Kai & Furuta, 1984, Masuda et al., 1996a, Masuda et al., 1996b, Masuda et al., 1992). Los cambios de virulencia se pueden asociar también a mutaciones en zonas reguladoras de los genomas virales o a sustituciones de aminoácido en proteínas no estructurales (Herrera et al., 2007, Tu et al., 1995).

Sin embargo, además de la presencia de mutantes específicos con propiedades alteradas en los espectros de mutantes, la complejidad del espectro de mutantes puede influir en el

comportamiento de un virus. Así, una mayor complejidad de la cuasiespecie de VHC en pacientes crónicamente infectados se corresponde con una menor probabilidad de eliminación del virus mediante tratamiento combinado de interferón- α con ribavirina (R) y con la progresión hacia la persistencia del virus (Farci et al., 2000, Pawlotsky, 2000, Pawlotsky et al., 1998). El incremento de fidelidad de copia de unas 3 a 5 veces de un mutante de poliovirus (PV) se asoció a una disminución del *fitness* viral y de la virulencia para ratones (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005a, Vignuzzi et al., 2006). El mutante de alta fidelidad generó un espectro de mutantes restringido que condujo a la pérdida de neurotropismo y a un fenotipo patogénico atenuado. La expansión de la diversidad de la cuasiespecie mediante mutagénesis química restauró el neurotropismo y la patogenia (Vignuzzi et al., 2006). Estos resultados establecen una relación directa entre la tasa de mutación, la complejidad del espectro de mutantes y la patogenia, y confirman el valor adaptativo de las altas tasas de error de los virus.

2.2 Catástrofe de error y mutagénesis letal como nueva estrategia antiviral

2.2.1 Concepto de catástrofe de error

Estudios teóricos sobre replicación de genomas con altas tasas de error predijeron la existencia de un umbral de error en la copia de material genético por encima del cual no es posible mantener la información genética de modo estable (Eigen, 2002, Eigen & Biebricher, 1988, Schuster & Stadler, 1999, Swetina & Schuster, 1982). Al proceso de superar ese umbral de error se conoce como entrada en catástrofe de error. Loeb y cols. denominaron mutagénesis letal al proceso de extinción de virus por aumento en la tasa de error [(Loeb et al., 1999, Loeb & Mullins, 2000); revisado en (Anderson et al., 2004, Domingo, 2005)]. Las poblaciones virales que replican con una fidelidad de copia por encima del umbral de error muestran la acumulación de mutaciones deletéreas de manera que todos los genomas pasan a estar sometidos a una selección negativa sin posibilidad de escape, lo que conduce a una pérdida de la información genética y, en consecuencia, a la extinción (**Figura 2.3**).

2.2.2 Evidencias experimentales de la entrada de virus en catástrofe de error

Aumentos de la tasa de error durante la replicación de virus RNA, debidos a la acción de agentes mutagénicos, pueden conducir a la extinción viral por mutagénesis letal. Ello ha sido corroborado con estudios tanto en cultivos celulares como *in vivo*.

2.2.2.1 Evidencias en cultivos celulares

El descenso de la producción viral o incluso la extinción del virus durante el tratamiento con agentes mutagénicos ha sido ampliamente documentado (Airaksinen et al., 2003, Crotty et al., 2001, Graci et al., 2007, Graci et al., 2008, Grande-Perez et al., 2005, Grande-Pérez et al.,

2002, Holland et al., 1990, Lanford et al., 2001, Lee et al., 1997, Loeb et al., 1999, Loeb & Mullins, 2000, Pariente et al., 2001, Sierra et al., 2000, Tapia et al., 2005). En nuestro laboratorio, el análisis de cuasiespecies procedentes de una infección persistente de VFA tratada con R reveló la presencia de un genoma inviable que contenía una polimerasa inactiva con las sustituciones G118D, V239M y G373D (Arias et al., 2005).

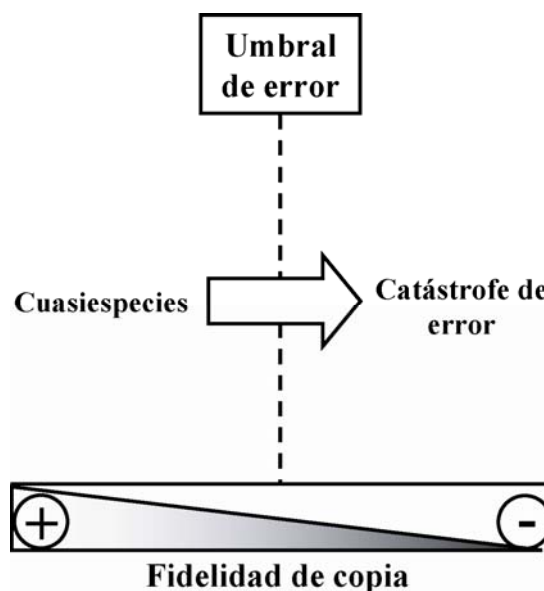


Figura 2.3 Esquema de la transición a mutagénesis letal por entrada en catástrofe de error. La tasa de mutación durante la replicación de los virus está determinada por la necesidad de la transmisión fiable de la información genética (Eigen, 2002). Cuando la fidelidad de copia disminuye hasta alcanzar el umbral de error, la cuasiespecie no tiene capacidad de adaptación por acumulación excesiva de mutaciones deletéreas y el sistema entra en catástrofe de error.

2.2.2.2 Evidencias *in vivo*

La administración de 5-fluorouracilo (FU) a ratones evitó el establecimiento de una infección persistente con LCMV (Ruiz-Jarabo et al., 2003). Se ha observado un aumento en la complejidad de las cuasiespecies de individuos crónicamente infectados con VHC tras el tratamiento con R (Asahina et al., 2005, Hofmann et al., 2007) y se han identificado mutaciones que mapean en la polimerasa de VHC asociadas a resistencia a R en pacientes tratados con la droga (Young et al., 2003). Aunque no hay acuerdo sobre el mecanismo de actuación de R sobre VHC, es posible que la mutagénesis tenga una participación (apartado 2.8.2.2.5).

2.2.2.3 Evidencias experimentales de catástrofe de error obtenidas en nuestro laboratorio

En nuestro laboratorio estamos empleando VFA, LCMV y VIH-1 como sistemas modelo para estudio de dinámica de cuasiespecies y mutagénesis letal. Las principales conclusiones de estos estudios, revisados en (Domingo, 2005, Domingo et al., 2008) han sido:

- i) Los agentes mutagénicos FU, 5-azacitidina (AZC) y R pueden producir la extinción de virus durante infecciones citolíticas o persistentes en cultivos celulares.
- ii) Una baja capacidad replicativa (*fitness*) y bajas cargas virales (bajo tamaño poblacional) favorecen la extinción viral.
- iii) La combinación de agentes mutagénicos con inhibidores de la replicación viral es más efectiva que los agentes mutagénicos administrados aisladamente en provocar la extinción del virus.
- iv) La transición hacia catástrofe de error ocurre con descensos de 10^2 a 10^3 veces en la infectividad específica y sin modificación de la secuencia consenso de la población. En cambio, se producen aumentos en la complejidad del espectro de mutantes de hasta 10 veces (medidos por frecuencia de mutación) y de hasta 7 veces (medidos por entropía de Shannon).
- v) RNA preextinción interfiere con la infectividad de RNA infeccioso presente en la misma población.
- vi) Datos experimentales e *in silico* sugieren una importante participación de genomas defectivos en el proceso de extinción.
- vii) Durante el proceso de evolución del virus en presencia del agente mutagénico, pueden surgir mutaciones de resistencia que acaben imponiéndose en la secuencia consenso y que aumenten la eficacia biológica del virus en presencia del mutágeno.

2.3 El virus de la fiebre aftosa (VFA) como modelo

2.3.1 La fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad que afecta a animales de pezuña hendida, entre los que se encuentran animales de los principales sectores ganaderos (fundamentalmente ganado bovino y porcino), y cuyo agente causal es el VFA. Históricamente la FA fue la primera enfermedad animal que se asoció a un agente replicante de tamaño inferior a una bacteria (Loeffler & Frosch, 1898). Es la enfermedad animal que causa más pérdidas económicas y, como ejemplo, el brote de FA en el Reino Unido en 2001 supuso pérdidas de 30.000 millones de euros (Sutmoller et al., 2003), revisado en (Sobrino & Domingo, 2004, Sobrino et al., 2001). Durante el desarrollo de un brote de FA no se producen altas tasas de mortalidad, pero sí de morbilidad (Brown, 2004, Rowlands, 2003).

Existen múltiples vías de transmisión del virus, incluidas el contacto directo, transporte mecánico, aerosoles, ingestión, etc. El virus penetra en el organismo a través de los epitelios causando una infección aguda caracterizada por fiebre y aftas, localizadas principalmente en lengua, boca y pezuñas. En animales adultos afectados de la enfermedad vesicular típica, la

mortalidad no suele superar el 5%, mientras que en animales jóvenes afectados de miocarditis asociada al VFA, la tasa de mortalidad se aproxima al 50% (Sobrino & Domingo, 2004). Tras la fase aguda de la enfermedad se puede establecer una infección asintomática en la que el virus persiste en el esófago y garganta por periodos prolongados de tiempo. Estos animales portadores constituyen una reserva natural de virus y pueden originar brotes de la enfermedad aguda, dificultando el control de la enfermedad (Gebauer et al., 1988, Pereira, 1981, Salt, 2004, Salt, 1993, van Bakkum et al., 1959). Las estrategias de control de la enfermedad utilizadas tradicionalmente se basan en la vacunación o el sacrificio de los animales infectados y sus contactos.

2.3.2 El virus de la fiebre aftosa

VFA pertenece al género aftovirus de la familia *Picornaviridae*. Los picornavirus poseen un genoma RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva de alrededor de 8 kb de longitud. Carecen de envuelta, y su cápsida es de simetría icosaédrica. Se han descrito siete serotipos distintos del VFA (A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2 y SAT3), más de 65 subtipos y numerosos variantes antigénicos (Carrillo et al., 2005, Mateu et al., 1988, Pereira, 1977). Esta grandísima diversidad antigénica es un reflejo de la alta variabilidad genética del VFA.

El VFA de referencia empleado en nuestro laboratorio es el C-S8c1, un clon biológico obtenido a partir de un virus proveniente de un cerdo enfermo, aislado en Santa Pau, Girona, en 1970 (virus C-Sta Pau Spain/1970) (Sobrino et al., 1983). Pertenece al subtipo europeo C₁ dentro del serotipo C. El genoma del VFA C-S8c1 tiene 8115 nucleótidos, sin contar los tramos homopoliméricos de policitidilato y poliadenilato, que son heterogéneos en longitud (Escarmís et al., 1992, Toja et al., 1999).

2.3.2.1 Organización genómica y funcional de VFA

El genoma de C-S8c1 se divide en una región central que contiene un único marco de lectura abierta comprendida entre los nucleótidos 1039 y 8023, que codifica una poliproteína de 2328 aminoácidos que se procesa por proteasas virales durante el ciclo de infección. La zona de lectura abierta está flanqueada por dos regiones más cortas no codificantes (5' UTR de 1038 nucleótidos y 3' UTR de 91 nucleótidos, excluyendo los tramos homopoliméricos), situadas en los extremos de la molécula de RNA y que incluyen elementos reguladores con complejas estructuras secundarias y terciarias (Flint et al., 2009, Martinez-Salas et al., 2002) (**Figura 2.4**).

La región 5' UTR está formada por varias subregiones que del sentido 5' al 3' son las siguientes:

- Fragmento S, de 367 nucleótidos, está plegado en forma de tallo con bucle (*stem loop*) se encuentra muy conservado entre distintos VFAs, y se predice que tiene un papel importante en replicación (Belsham, 1993, Escarmís et al., 1992, Witwer et al., 2001).

- Poli(C), de función desconocida, con una longitud variable de 100 a 400 nucleótidos, que se encuentra también presente en cardiovirus pero no en otros picornavirus.
- Pseudonudos: son una serie de repeticiones con una estructura terciaria típica (Pleij et al., 1985), de función desconocida (Escarmís et al., 1995, Escarmís et al., 1992).
- OriI ó *cre*: (*cis acting replication element*) elemento replicativo que actúa en *cis* con estructura de *stem loop* y que tiene una función importante en la síntesis de RNA (Mason et al., 2002, Nayak et al., 2005) (apartado 2.5). Se ha observado complementación de la función de *cre* en *trans* (Tiley et al., 2003). El elemento oriI de VFA colocaliza con el dominio 1 del IRES, siendo incompatible la presencia de ambas estructuras al mismo tiempo (Belsham & Martínez-Salas, 2004).
- IRES: (*Internal Ribosome Entry Site*) región interna altamente estructurada del RNA genómico que permite la entrada del ribosoma para la iniciación interna de la síntesis de la poliproteína viral de una forma independiente de *cap* (Belsham & Sonenberg, 1996, Jang et al., 1990, Martinez-Salas, 2008, Martinez-Salas & Fernandez-Miragall, 2004, Martinez-Salas et al., 2008, Pelletier & Sonenberg, 1988).

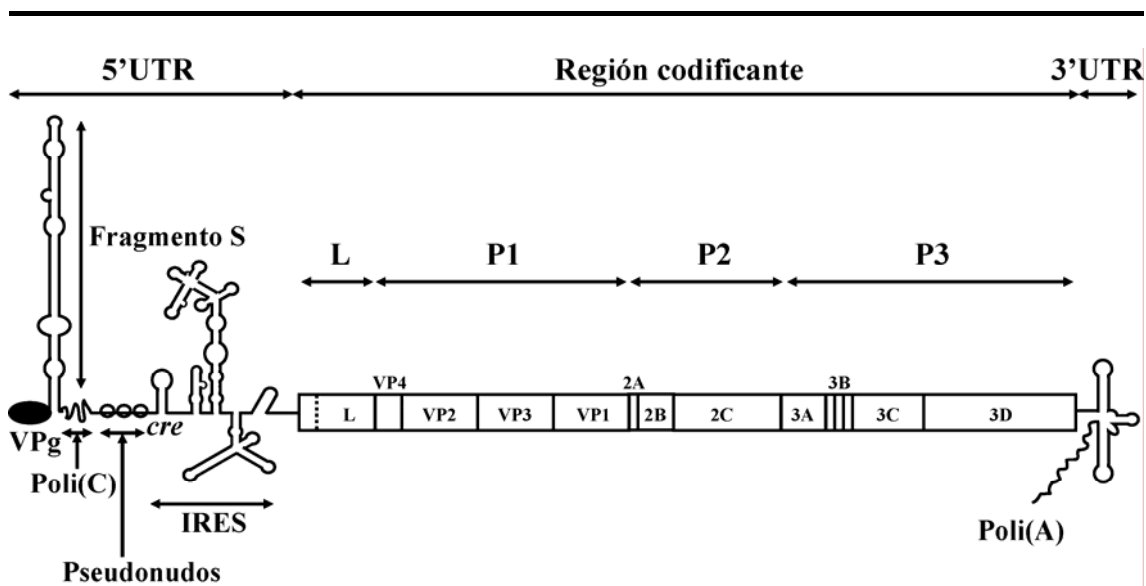


Figura 2.4 Organización genómica de VFA. El genoma de VFA se organiza en una región codificante de la poliproteína viral flanqueada por dos regiones no codificantes, 5' UTR y 3' UTR, en el extremo 5' y 3', respectivamente. Mediante el procesamiento de la poliproteína viral se libera una proteína L y se generan las proteínas estructurales (región P1), que incluyen las proteínas de la cápsida VP4, VP2, VP3 y VP1 y las proteínas no estructurales (regiones P2 y P3), que incluyen las proteínas 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D. VPg (3B) está unida covalentemente al extremo 5' del genoma viral.

La poliproteína está dividida en 4 regiones, que desde el extremo amino(N)-terminal al carboxilo(C)-terminal son las siguientes:

- La región L (*Leader*) codifica las proteínas Lab y Lb, según comience la lectura en el primer o segundo AUG funcional (Devaney et al., 1988). L es una proteasa activa en *cis*

y *trans* que cataliza su propia separación de la poliproteína e inicia la proteólisis del factor eIF4F de iniciación de la traducción dependiente de *cap*, lo que contribuye a una parada de la síntesis de proteínas celulares (*shut-off*) en las células infectadas (Devaney et al., 1988, Glaser & Skern, 2000). Los residuos catalíticos esenciales de la enzima han sido identificados (Piccone et al., 1995, Roberts & Belsham, 1995), y se ha determinado su estructura tridimensional (Guarne et al., 1998). Recientemente se ha descrito una inhibición mediada por L de la respuesta inmune innata (de Los Santos et al., 2006).

- La región P1 codifica las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4, que forman la cápsida del virus, de simetría icosaédrica y de unos 30 nm de diámetro (Acharya et al., 1989, Lea et al., 1994). VP1, VP2 y VP3 están parcialmente expuestas al exterior mientras que VP4 forma la superficie interna y está en contacto con el RNA viral. Algunos de los bucles y láminas de las proteínas de la cápsida del VFA se encuentran expuestos al exterior e interactúan con anticuerpos. El bucle G-H de la proteína VP1 (aminoácidos 140-160) muestra movilidad en la superficie de la cápsida (Jackson et al., 2003) y contiene uno de los principales determinantes antigénicos del VFA que se ha denominado sitio A (Mateu, 1995, Mateu et al., 1990, Mateu et al., 1989). Este sitio incluye el triplete RGD que interactúa con integrinas celulares que actúan como receptores para la entrada del virus (Baranowski et al., 2003, Baxt & Rieder, 2004, Berinstein et al., 1995, Fry et al., 2005). Se conoce la estructura tridimensional de varios aislados de VFA, incluido el C-S8c1 (Lea et al., 1994).
- La región P2 codifica las proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C:
 - 2A es un péptido de 16 aminoácidos que cataliza en *cis* la escisión de P1-2A de 2BC, mediante un proceso de parada y reiniciación del ribosoma (de Felipe et al., 2003, de Felipe & Ryan, 2004, Ryan & Flint, 1997).
 - La proteína 2B ha sido asociada en VFA al bloqueo de secreción de proteínas cuando se coexpresa con 2C (Moffat et al., 2007) pero no por sí sola (de Jong et al., 2008). Según estudios con otros picornavirus, podría estar implicada en permeabilidad de membranas (van Kuppeveld et al., 1997) y en el bloqueo de la secreción de proteínas (Doedens & Kirkegaard, 1995).
 - La proteína 2C tiene asociadas varias funciones dentro del ciclo infeccioso de picornavirus (apartado 2.7).
- La región P3 codifica las proteínas no estructurales 3A, 3B, 3C y 3D:
 - 3A: En otros picornavirus 3A participa en la síntesis del RNA viral (Gromeier et al., 1999, Takeda et al., 1986), en el anclaje a membrana del complejo de replicación (Xiang et al., 1998), en el efecto citopático y en la inhibición de la secreción de proteínas (Doedens & Kirkegaard, 1995). Sustituciones de aminoácidos en la proteína 3A de VFA se han asociado a la adaptación de un virus de cerdo a cobayas (Núñez et al., 2001) y a la atenuación para bovinos (Beard & Mason, 2000, Giraudo et al., 1990, O'Donnell et al., 2001).

- 3B (VPg) está unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico del virus y está implicada en la iniciación de la síntesis de RNA y probablemente también en la encapsidación (Ferrer-Orta et al., 2006a, Rowlands, 1999). En VFA, la región 3B codifica 3 VPgs diferentes.
- 3C es una serín proteasa que cataliza la mayor parte de las roturas hidrolíticas de la poliproteína del VFA. 3C también es capaz de romper los factores de iniciación de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham et al., 2000).
- 3D es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) encargada de la replicación del virus (replicasa viral) (apartados 2.5 y 2.6.1).

La región 3' no codificante posee una longitud de 91 nucleótidos y está implicada en replicación, infectividad y regulación de la traducción (Lopez de Quinto et al., 2002, Mirmomeni et al., 1997, Saiz et al., 2001). El extremo 3' está constituido por un tramo de poliadenilato, poli(A), de una longitud de 60-90 residuos, típico de un RNA mensajero eucariótico, que interviene en la circularización del genoma, previamente al inicio de la replicación (Herold & Andino, 2001, Serrano et al., 2006).

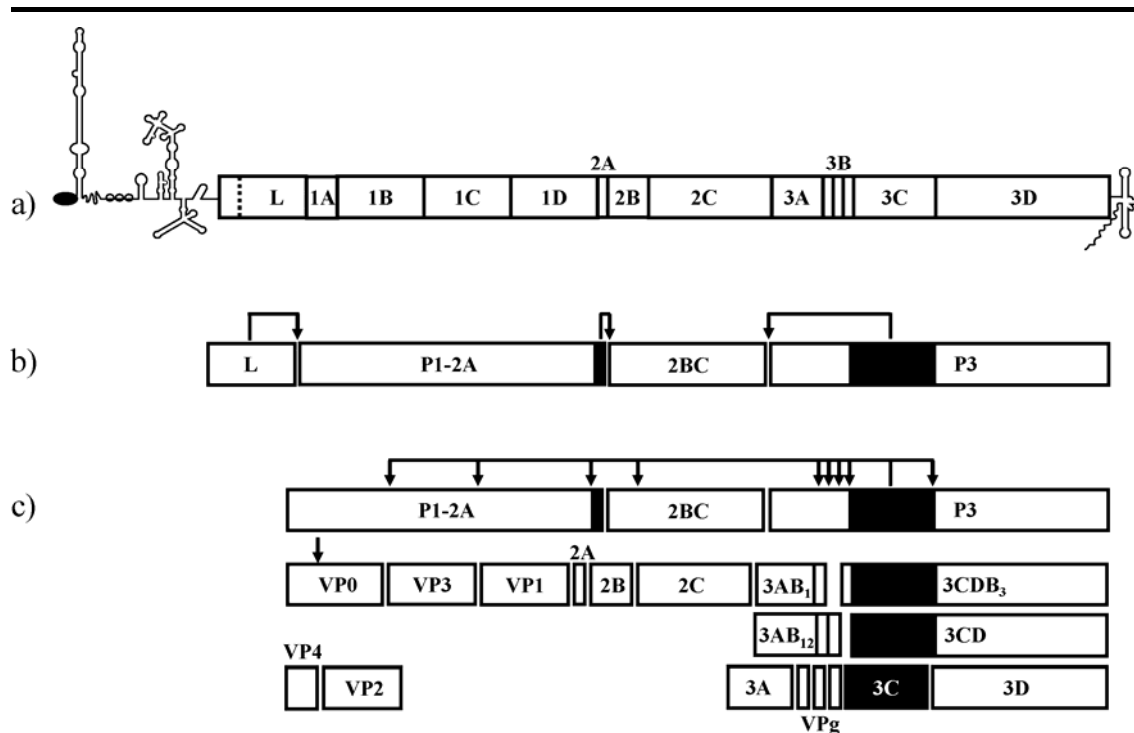


Figura 2.5. Representación esquemática del procesamiento de la poliproteína viral. a) Genoma del VFA. b) Se representan los productos que se generan durante y después de la síntesis de la poliproteína viral. La separación entre L y P1-2A se produce por el corte catalizado por L. El corte entre P1-2A y 2BC se produce por un “salto” de la síntesis de proteína mediado por 2A. El corte entre 2BC y P3 se produce por 3C. c) Los polipéptidos obtenidos tras la síntesis de la poliproteína viral se procesan en *trans* por 3C dando lugar a los diferentes precusores y proteínas maduras. Finalmente se produce el procesamiento de VP0 durante la encapsidación (Rowlands, 2003, Sobrino & Domingo, 2004). El procesamiento de P1-2A por 3C genera VP0-VP3-VP1 que se ensambla formando pentámeros; 12 pentámeros se ensamblan para formar la partícula vírica. El genoma viral participa en el corte de VP0 en VP4-VP2, como última fase de la maduración de la partícula.

2.4 Traducción del genoma viral y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral

El RNA del VFA es infeccioso, y tras la entrada en el citoplasma de la célula, debe ser traducido para dar lugar a las proteínas virales necesarias para la replicación viral y el ensamblaje del RNA en nuevos viriones. La traducción se produce de manera independiente de *cap* a partir de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) que procede a los 2 codones AUG de iniciación funcionales. El procesamiento de la poliproteína se produce parcialmente durante su síntesis y se resume en la **Figura 2.5**.

2.5 Replicación del genoma del virus de la fiebre aftosa

Una vez procesada la poliproteína, el RNA genómico sirve de molde para la síntesis de la cadena complementaria de RNA de polaridad negativa, catalizada por la RpRd codificada por la región 3D del genoma (**Figuras 2.4 y 2.5**). La polimerasa (denominada 3D) utiliza como cebador el péptido VPg y adiciona un residuo de uridina-5'-monofosfato (UMP) a la Tyr que se encuentra en posición 3 del péptido VPg (Ferrer-Orta et al., 2006a, Nayak et al., 2005, Paul et al., 2003a, Paul et al., 1998). Mutantes que carecen de alguna de las tres VPg codificadas por el genoma viral muestran una desventaja en replicación respecto al virus estándar (Falk et al., 1992, Mason et al., 2003). La uridilación de VPg requiere el elemento oriI y es estimulada por 3CD (Marcotte et al., 2007, Nayak et al., 2005, Nayak et al., 2006, Paul et al., 2000, Yin et al., 2003). En cambio, la iniciación de la síntesis de la cadena negativa no requiere oriI (Goodfellow et al., 2003, Morasco et al., 2003, Murray & Barton, 2003). El actual modelo de inicio de replicación para picornavirus se basa en el modelo de PV (**Figura 2.6**). Varios productos intermediarios del procesamiento de la poliproteína intervienen en la replicación del virus [revisiones en (Racaniello, 2001, Rowlands, 2003, Semler & Wimmer, 2002)], apoyando el concepto de que varios precursores y proteínas procesadas son multifuncionales [revisiones en (Rowlands, 2003) y varios capítulos de (Sobrino & Domingo, 2004)].

2.6 Las polimerasas de ácidos nucleicos

Las polimerasas que catalizan la síntesis de DNA y RNA son enzimas esenciales para la transferencia de la información genética y su expresión. Las polimerasas de virus animales y bacterianos participan en una gran diversidad de estrategias replicativas, lo que se pone de manifiesto en la iniciación de la polimerización *de novo* a partir de DNA, RNA o de proteínas iniciadoras. A pesar de ello, todas las polimerasas comparten estructuras y mecanismos de catálisis similares (Steitz, 1998). Todas ellas se pliegan en forma parecida a la de una mano derecha y se han distinguido tres subdominios denominados *palm*, *fingers* y *thumb* (Alba, 2001, Jager & Pata, 1999), con la excepción de la polimerasa X del virus de la peste porcina africana que carece del subdominio *fingers* (Maciejewski et al., 2001, Showalter et al., 2001). Las DNA y RNA polimerasas presentan cierta identidad de secuencia, con algunos motivos presentes en

todas ellas y otros que distinguen a las polimerasas dependientes de DNA de las polimerasas dependientes de RNA (Beard & Wilson, 2003, Delarue et al., 1990, Ferrer-Orta et al., 2006b, Joyce & Steitz, 1995, Willis et al., 2002).

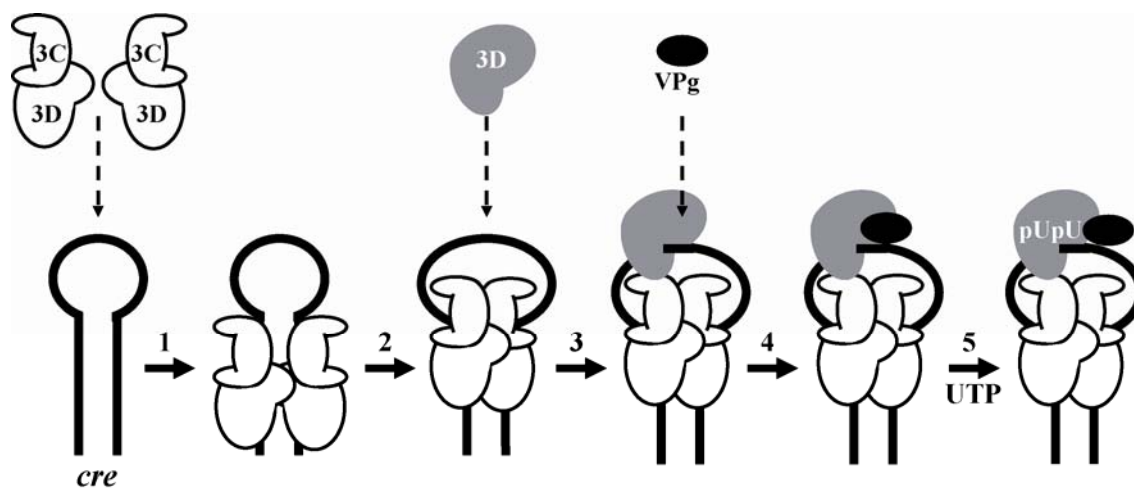


Figura 2.6. Modelo del inicio de la replicación de la síntesis de cadena positiva en poliovirus. 2 moléculas de 3C ó 3CD se unen a oriI (*cre*) (1) (Pathak et al., 2007). Se produce la isomerización del complejo lo que permite que se desenrollen las hebras que conforman la horquilla y se extienda la región que sirve como molde de la uridilación de VPg (2) (Pathak et al., 2007, Shen et al., 2007). 3D se une al complejo y lo estabiliza mediante interacción con las dos subunidades del dímero formado por las 2 moléculas de 3C ó 3CD (3) (Pathak et al., 2007, Pathak et al., 2002, Shen et al., 2008, Shen et al., 2007). 3B (VPg) [o un precursor donador de 3B como 3BC ó 3BCD (Nayak et al., 2006, Pathak et al., 2008)] se une al complejo, probablemente en el sitio de unión de RNA de 3D (4) (Amero et al., 2008, Ferrer-Orta et al., 2006a). En presencia de UTP, el grupo hidroxilo del residuo Tyr-3 de VPg se uridila por 3D para producir Vpg monouridilada (VPg-pU), que, a su vez, mediante un mecanismo de deslizamiento hacia atrás (*slide-back*), puede nuevamente uridilarse para dar lugar a VPg diuridilada (VPg-pUpU) (5) (Paul et al., 2003b). El complejo replicativo es translocado al poli(A) 3' terminal para proseguir la copia de la cadena positiva (Larsen et al., 1980, Spector & Baltimore, 1975).

Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) (E.C. 2.7.7.48) víricas carecen de una actividad exonucleasa 3'→5' presente en varias DNA polimerasas celulares y de virus complejos como adenovirus, herpesvirus y poxvirus (Bernad et al., 1989). La exonucleasa 3'→5' actúa como actividad correctora de pruebas y su ausencia es uno de los determinantes de las tasas de error elevadas típicas de los virus RNA (Batschelet et al., 1976, Domingo, 2007, Drake & Holland, 1999, Eckerle et al., 2007) (apartado 2.1.1).

2.6.1 La polimerasa del virus de la fiebre aftosa (3D)

La replicación del genoma del VFA y de otros picornavirus está catalizada por la RdRp 3D (apartado 2.5 y **Figura 2.6**). La estructura tridimensional de la 3D de VFA (**Figura 2.7**) aislada y en un complejo con una molécula molde-iniciador de RNA se resolvió en el laboratorio de la Dra. Nuria Verdaguer (IBMB, CSIC), en colaboración con nuestro grupo (Ferrer-Orta et al., 2004).

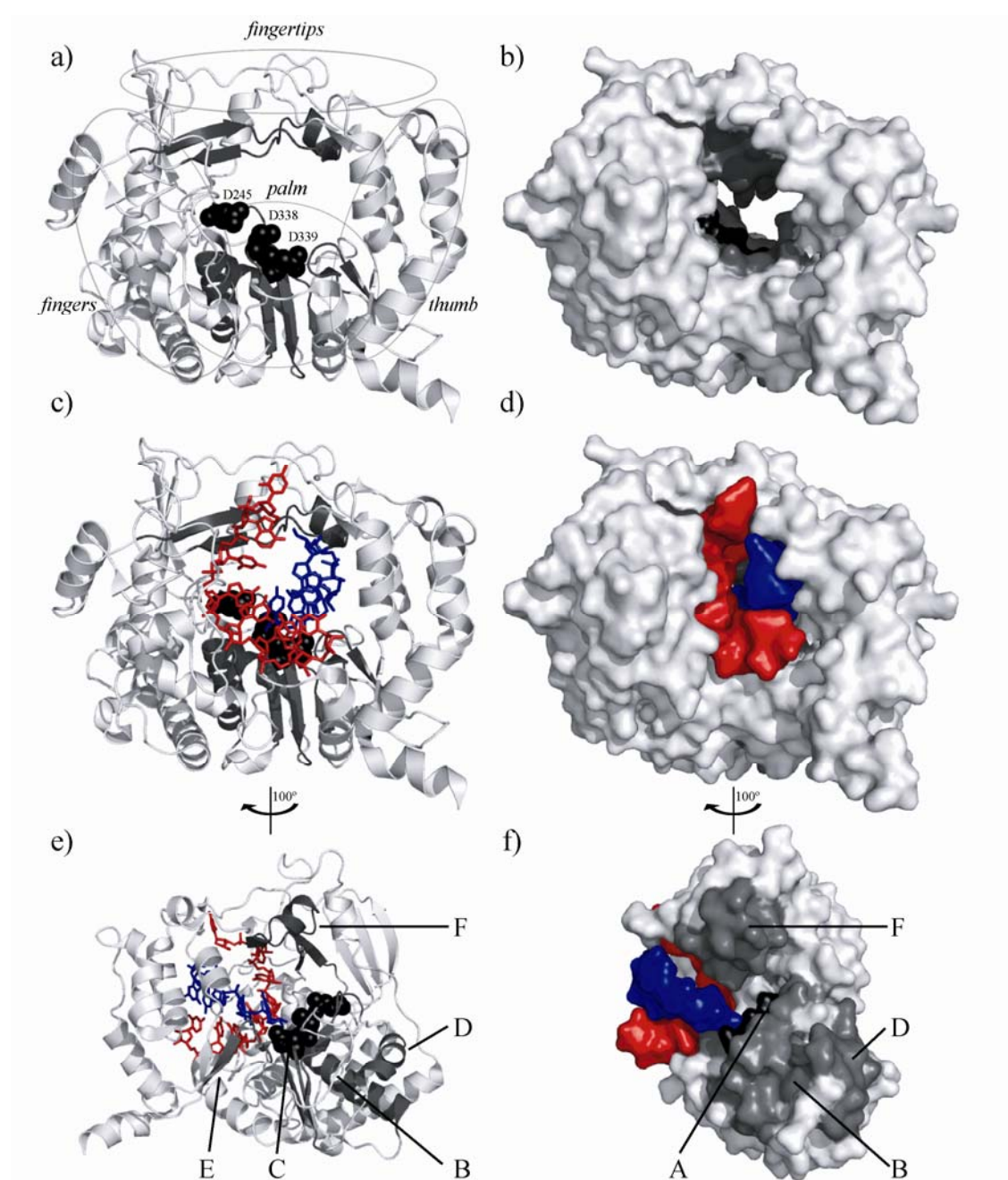


Figura 2.7. Representación de la estructura tridimensional de la RdRp de VFA (3D). **a)** Representación en forma de lazos de 3D. Se observa una estructura general en forma de mano derecha como en la mayoría de DNA y RNA polimerasas descritas. Los subdominios *palm*, *thumb*, *fingers* y *fingertips* se muestran dentro de elipses. Los residuos D245, D338 y D339 que conforman el conjunto de aspárticos catalíticos se representan como esferas negras. Los motivos conservados dentro del dominio *palm* (motivos A,B,C,D y E) y dominio *fingers* (motivo F) se representan en gris oscuro. **b)** Representación de la superficie tridimensional de 3D mostrada en a). **c)** Representación en forma de lazos de 3D formando un complejo con un molde-iniciador. Se muestra la estructura tridimensional de 3D co-cristalizada con una molécula de RNA parcialmente autocomplementaria de 10 nucleótidos, de secuencia 5'-GCAUGGGCCCC-3', tal como se describe en (Ferrer-Orta et al., 2004). En rojo se muestra la cadena molde y en azul la cadena cebadora. El resto de colores empleados son los mismos que en a). **d)** Representación de la superficie tridimensional de 3D mostrada en c). **e)** Vista girada 100° hacia la izquierda en el plano vertical de la representación en forma de lazos de 3D mostrada en c). Los colores utilizados son los mismos que en c). Se indican los motivos B,C,D y E conservados dentro del subdominio *palm* y motivo F conservado en el subdominio *fingers*. Los aspárticos

catalíticos D338 y D339 están dentro del motivo A, el aspártico catalítico D245 está dentro del motivo B. **f)** Vista girada 100° hacia la izquierda en el plano vertical de la representación de la superficie tridimensional de 3D mostrada en d). Se han eliminado varios aminoácidos de la estructura para permitir la visualización del RNA. Los colores utilizados son los mismos que en d). Se indican los motivos A,B,D conservados dentro del subdominio *palm*, y el motivo F en el subdominio *fingers*. Las figuras se han realizado empleando el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC). Las coordenadas cristalográficas utilizadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>; código 1WNE).

Las RdRp presentan una conformación de mano derecha y cerrada, a diferencia de la mano abierta o en forma de U de las DNA polimerasas (dependientes de RNA o DNA) (Steitz, 1999) y de las RNA polimerasas celulares (dependientes de DNA) (Kettenberger et al., 2004, Tahirov et al., 2002, Woychik & Hampsey, 2002). Esta circularización completa de la estructura se establece mediante un subdominio adicional en las RdRp denominado *fingertips* (Bressanelli et al., 1999, Butcher et al., 2001, Ferrer-Orta et al., 2006b, Love et al., 2004, Ng et al., 2002, Ng et al., 2004, Thompson & Peersen, 2004) que hace de puente entre los subdominios *fingers* y *thumb* (**Figura 2.7**). En la polimerasa del VFA (3D) el dominio *fingertips* esta compuesto por los residuos 1 al 57, el dominio *fingers* por los residuos 58-207 y 249-302, el dominio *palm* por los residuos 208-248 y 303-343 y el subdominio *thumb* por los residuos 404-470 (**Figura 2.7**).

Dentro del subdominio *fingers* se encuentra el motivo F, conservado en todas las RdRp, que forma un túnel cargado positivamente, implicado en unión del NTP entrante y con una posible actividad helicasa sobre RNA de doble banda (Bruenn, 2003). En el subdominio *palm* se encuentran los motivos A, B, C, D y E, conservados en las RdRp y otras polimerasas como la RT de VIH-1 (Bruenn, 2003, Ferrer-Orta et al., 2006b, Ferrer-Orta et al., 2004, Gorbalenya et al., 2002, Hansen et al., 1997, Xu et al., 2003). El centro catalítico de todas las RdRp se encuentra en el subdominio *palm*, que es el más conservado en las polimerasas estudiadas (O'Reilly & Kao, 1998). El centro catalítico de la 3D de VFA incluye los residuos D245 (en el motivo A) y los residuos D338 y D339 (en el motivo C) (**Figuras 2.7 y 2.8**).

La estructura del complejo de la 3D polimerasa de VFA con una molécula de RNA, que actúa de molde-iniciador [**Figura 2.7(c) y (d)**], proporcionó la primera información de los residuos implicados en la interacción con el RNA de las RdRp de los picornavirus (Ferrer-Orta et al., 2004). Tanto el complejo con el RNA como con la proteína iniciadora VPg (descrita en 2.3.2) muestra la formación de un amplio túnel central capaz de acomodar la doble hélice de RNA durante la fase de elongación o a la proteína VPg durante el inicio de la replicación del RNA (**Figura 2.9**) (Ferrer-Orta et al., 2006a, Ferrer-Orta et al., 2006b). Recientemente, se ha resuelto la estructura de 3D formando complejos catalíticos con RNA y diferentes nucleótidos y análogos de nucleótido con los que se ha podido estudiar el mecanismo de elongación de un molde iniciador de RNA por 3D a nivel estructural (Ferrer-Orta et al., 2007).

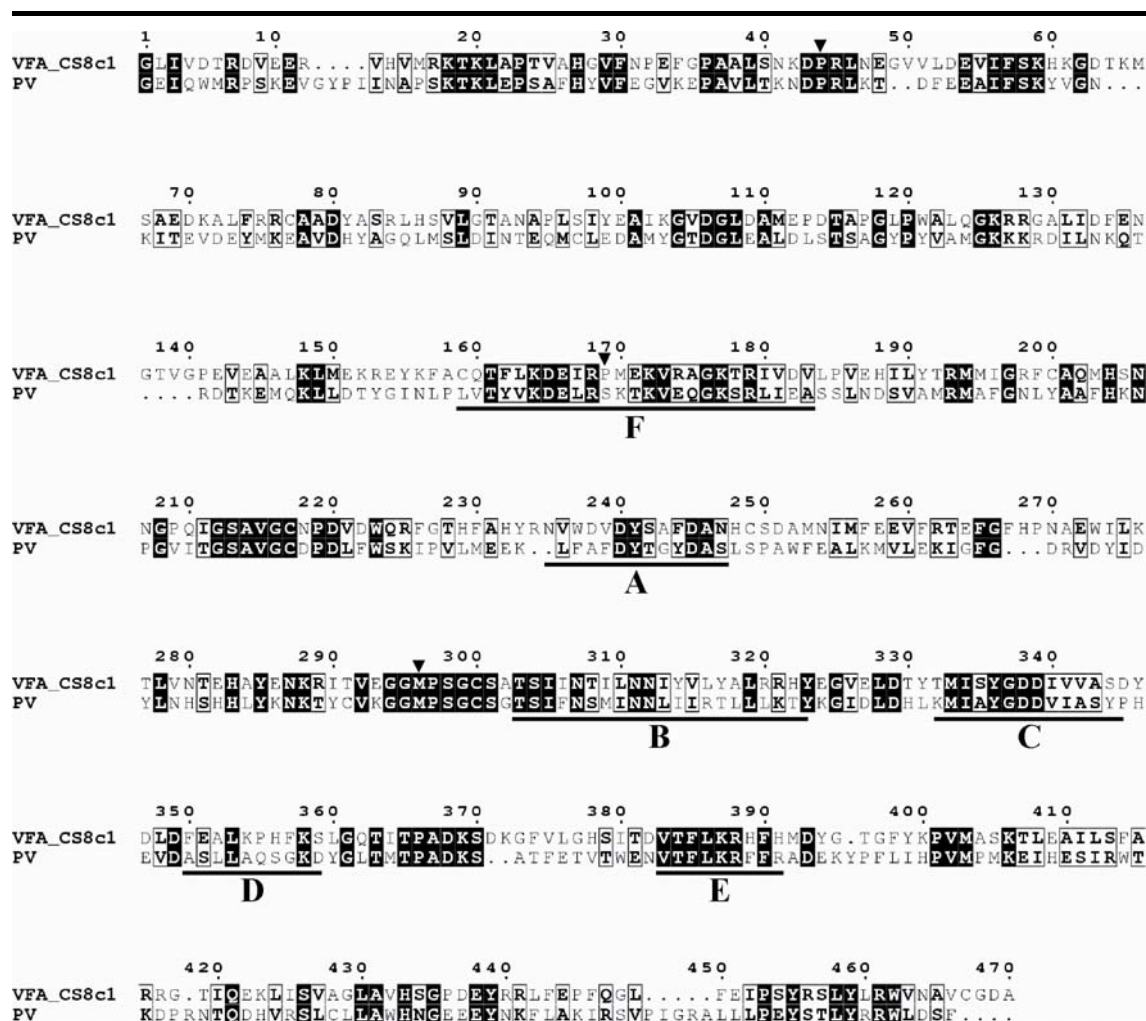


Figura 2.8. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la 3D de VFA y PV. Los aminoácidos de 3D idénticos entre las dos polimerasas se muestran en cajas negras. La numeración de los residuos se realiza tomando como origen la glicina del extremo N-terminal de la 3D de VFA. Los residuos P44, P169S y M296 están indicados con triángulos negros. El alineamiento se ha realizado con el servidor informático ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y el resultado se ajusta manualmente en base a los datos de la estructura tridimensional de 3D de VFA (Ferrer-Orta et al., 2004). Se indican los motivos conservados en las RdRp: F, A, B, C, D y E.

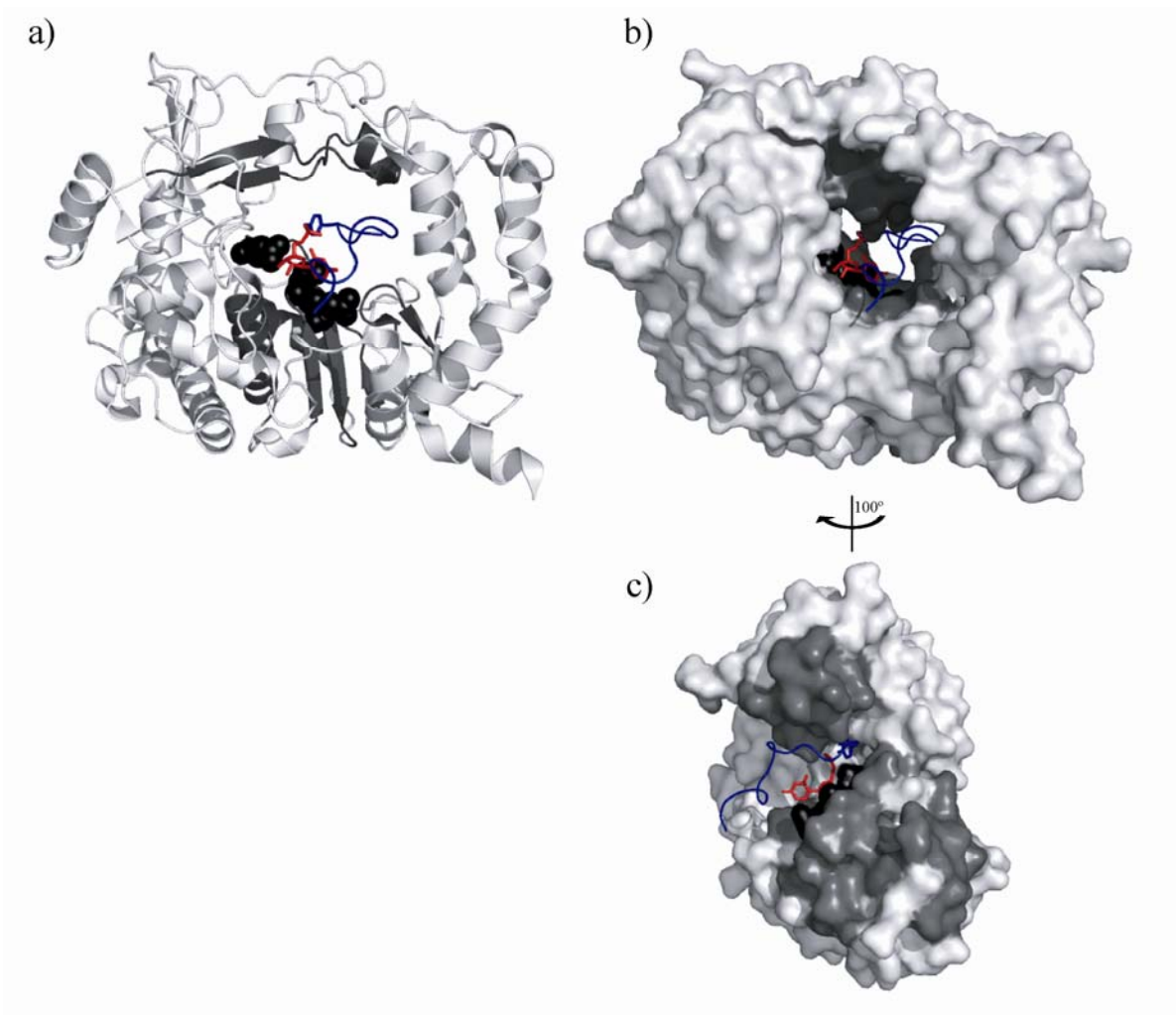


Figura 2.9. Estructura tridimensional de la polimerasa de VFA formando un complejo con un péptido iniciador VPg. a) Representación en forma de lazos de 3D de la estructura tridimensional de 3D formando un complejo con el péptido VPg (azul), covalentemente unido a través del aminoácido Y3 (se indica la cadena lateral) a una molécula de UMP incorporado (rojo). (Ferrer- Orta y cols. 2006a). Los residuos D245, D338 y D339 que conforman el conjunto de aspárticos catalíticos se indican como esferas negras. Los motivos conservados dentro del subdominio *palm* se representan en gris oscuro. b) Representación de la superficie tridimensional de 3D mostrada en a). c) Vista girada 100° hacia la izquierda en el plano vertical de la representación en forma de lazos de 3D mostrada en b). Se han eliminado varios aminoácidos de la estructura para permitir la visualización de VPg y UMP. Los colores utilizados son los mismos que en a). Las figuras se han realizado con el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas [PDB; <http://www.pdb.org>; código 2F8E].

2.7 Proteína 2C

La proteína 2C de VFA (de 318 aminoácidos y 35,9 kDa de masa molecular), es una de las proteínas más conservadas en picornavirus. Presenta 3 motivos conservados que aparecen típicamente en las proteínas con unión a NTPs (motivo A y B) o en miembros de la superfamilia 3 de helicasas (motivo C) (**Figura 2.10**) (Gorbalenya & Koonin, 1989, Gorbalenya et al., 1988,

Gorbalenya et al., 1990, Walker et al., 1982). El sitio A, cuya secuencia consenso es GXXXXGKS donde X representa cualquier aminoácido (₁₁₀GKSGQGKS₁₁₇ en VFA) está involucrado en la unión del nucleótido de purina a través de los grupos fosfato, mientras que el sitio B, formado por 2 residuos Asp precedidos por un tramo de aminoácidos hidrofóbicos (₁₅₆VVVMDD₁₆₁ en VFA), une Mg²⁺, necesario para catalizar la escisión del fosfato-γ del NTP (Gorbalenya et al., 1990, Walker et al., 1982). El motivo C consiste en un residuo de asparragina precedido de un tramo de residuos hidrofóbicos (₂₀₂IIATTN₂₀₇ en VFA) (**Figura 2.11**).

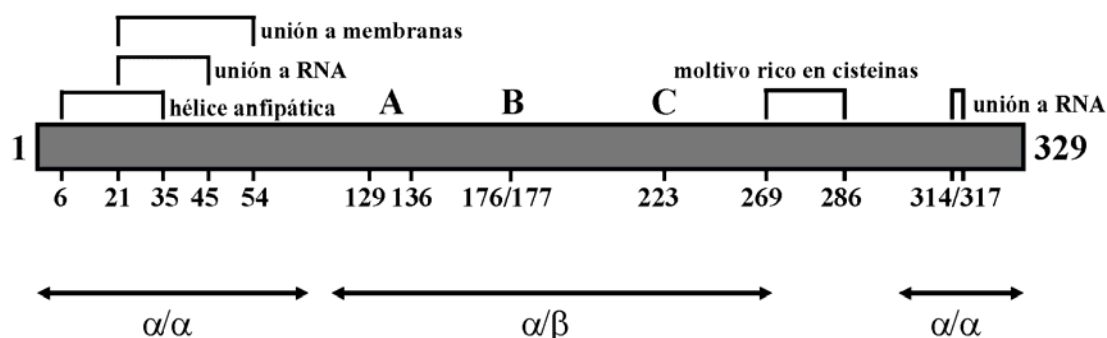


Figura 2.10. Esquema de dominios funcionales de la proteína 2C de poliovirus. La numeración de los residuos se realiza tomando como origen el aminoácido N-terminal de 2C de PV. Las regiones de la proteína 2C con función descrita se indican entre corchetes. A, B y C indican los motivos conservados entre los miembros de la superfamilia 3 de helicasas. Las flechas indican la organización en dominios de la proteína predichos a partir de la estructura secundaria (Teterina et al., 1997b).

La proteína 2C contiene dos regiones capaces de reconocer RNA situadas en los extremos N- y C-terminal (Rodríguez & Carrasco, 1995), habiéndose demostrado la unión a RNA tanto *in vivo* (Bienz et al., 1990) como *in vitro* (Rodríguez & Carrasco, 1993). Se ha sugerido que esta unión puede ser específica de secuencia, como en PV, virus de la hepatitis A (VHA) y rinovirus humano (HRV) (Banerjee & Dasgupta, 2001, Banerjee et al., 1997) o inespecífica de secuencia, como ocurre con echovirus-9 (E9) (Klein et al., 2000a). La predicción de la estructura a partir de la secuencia de aminoácidos indica que el extremo N-terminal forma una hélice anfipática, implicada junto con una región del extremo C-terminal, en la unión a membranas (Echeverri et al., 1998, Echeverri & Dasgupta, 1995, Paul et al., 1994, Teterina et al., 1997b). En PV se ha visto que 2C contiene un motivo rico de cisteína en el extremo C-terminal conservado en muchos miembros de picornavirus, pero no en 2C de VFA; este motivo parece estar implicado en la replicación de RNA (Pfister y cols. 2000) (**Figura 2.11**). Se ha demostrado que la proteína 2C tiene actividad ATPasa y GTPasa *in vitro* (De Palma et al., 2008, Klein et al., 1999, Mirzayan & Wimmer, 1994, Pfister & Wimmer, 1999, Rodríguez & Carrasco, 1993, Samuilova et al., 2006). No se le ha podido atribuir actividad helicasa (Rodríguez & Carrasco, 1993), aunque el mantenimiento de la integridad de los motivos A, B y C es indispensable para la actividad ATPasa *in vitro* (Pfister & Wimmer, 1999).

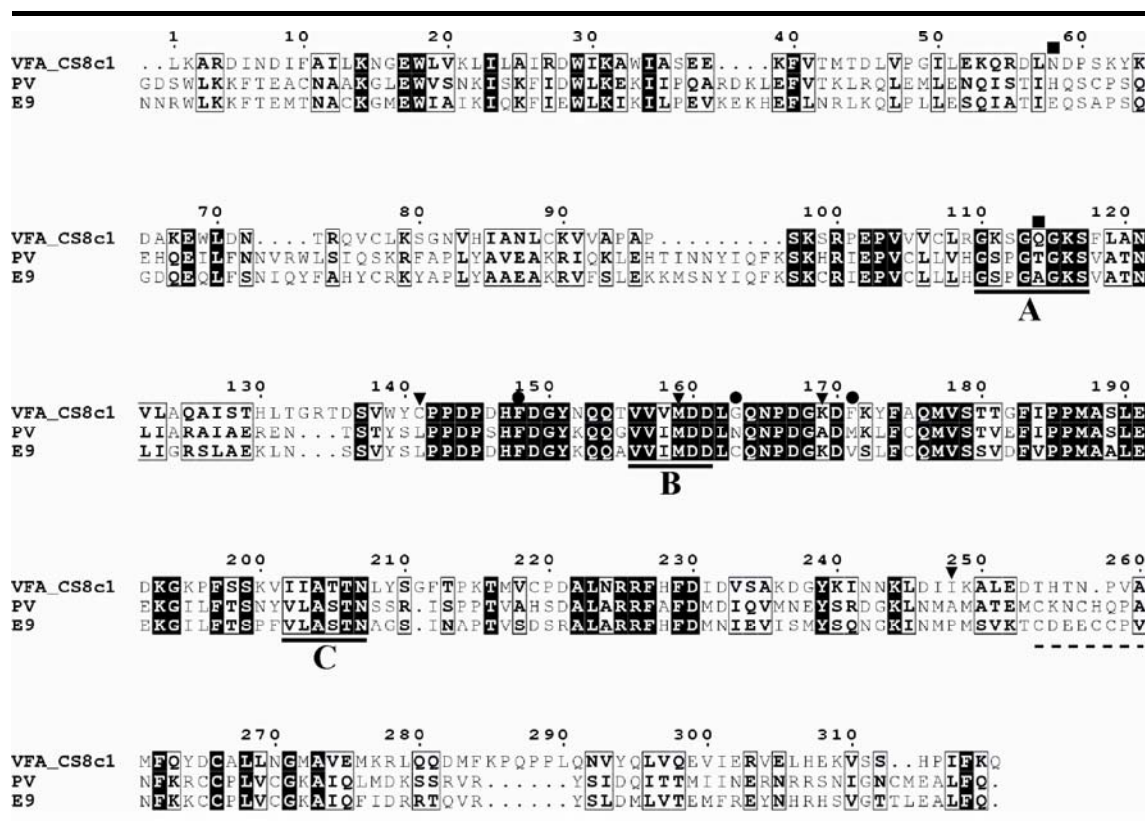


Figura 2.11. Alineamiento de secuencia aminoacídica de la 2C de VFA, PV y E9. Los aminoácidos de 2C idénticos entre las 3 proteínas se muestran en cajas negras. La numeración de los residuos se realiza tomando como origen la leucina del extremo N-terminal de la 2C de VFA. Los triángulos negros indican la localización de mutaciones de resistencia a hidrocloreuro de guanidinio (GuH) que mapean en la región 2C de VFA. Los círculos negros indican las mutaciones de resistencia a GuH de PV y los cuadrados negros mutaciones de resistencia a GuH de E9. Se indican los motivos conservados en 2C de picornavirus: A, B y C. La línea discontinua indica la zona rica en C presente en PV y E9. El alineamiento se ha realizado con el servidor informático ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

No se conoce el papel exacto de 2C en el ciclo infeccioso de picornavirus. Se sabe que participa en el reordenamiento de membranas que ocurre durante la infección, tanto sola como acompañada de 2B y que es indispensable para la replicación del virus realizada en los complejos de replicación asociados a membranas (Aldabe & Carrasco, 1995, Bienz et al., 1987, Bienz et al., 1992, Bienz et al., 1990, Cho et al., 1994, Gromeier et al., 1999, Pfister & Wimmer, 1999, Rodriguez & Carrasco, 1993, Teterina et al., 1997a, Teterina et al., 1997b, Tolskaya et al., 1994). Está involucrada en la regulación de la actividad de 3C en poliovirus (Banerjee et al., 2004) y hay indicios de que interacciona con 3A(B) (Teterina et al., 2006, Yin et al., 2007). Participa en procesos de desencapsidación del virión (Li & Baltimore, 1990) y de encapsidación (Vance et al., 1997, Verlinden et al., 2000) y es indispensable para la uridilación de VPg (Lyons et al., 2001). En 2C mapean mutaciones asociadas a la adaptación al hospedador para VHA (Frings & Dotzauer, 2001) y VFA (Nuñez et al., 2001, Sanz-Ramos et al., 2008), así como determinantes implicados en la virulencia de VHA (Raychaudhuri et al., 1998) y de VFA

(Herrera et al., 2007). Recientemente se ha propuesto que 2C puede actuar como chaperona de ribonucleoproteínas (Steil & Barton, 2008).

En la región 2C de varios picornavirus mapean mutaciones de resistencia a varios inhibidores de la replicación, como distintos derivados de benzoimidazol (De Palma et al., 2008, Hadaschik et al., 1999, Klein et al., 2000b, Shimizu et al., 2000) e hidrocloreuro de guanidinio (GuH) (Baltera & Tershak, 1989, Belsham & Normann, 2008, de la Torre et al., 1990, Pariente et al., 2003, Pincus et al., 1986, Pincus & Wimmer, 1986, Saunders & King, 1982, Saunders et al., 1985) (**Figura 2.11**). GuH actúa sobre 2C inhibiendo la síntesis de cadena negativa (Barton & Flanagan, 1997, Teterina et al., 2001).

En nuestro laboratorio, durante el estudio del efecto antiviral de R en VFA, ha surgido una mutación de resistencia en la región genómica 2C (apartado 5.3 de Resultados) que es la misma que ha aparecido independientemente en virus que mostraron resistencia a GuH (Pariente et al., 2003), o en virus adaptados a ratón (Sanz-Ramos et al., 2008). En esta Tesis Doctoral se ha caracterizado bioquímicamente la proteína 2C de VFA comparada con la proteína 2C mutante para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a R mediada por 2C (Apartado 5.4 de Resultados).

2.8 Análogos de nucleósido como agentes antivirales para VFA

Los análogos de base o de nucleósido son una importante clase de compuestos utilizados en terapia para el cáncer y en el tratamiento de varias enfermedades microbianas. Normalmente, estos compuestos se administran como pro-drogas que necesitan convertirse dentro de las células en metabolitos activos para ejercer su actividad antiviral. En la presente Tesis Doctoral se han utilizado el análogo de base 5-fluorouracilo (FU) y de nucleósido ribavirina (R) como agentes mutagénicos para VFA, y sus derivados nucleótido trifosfatos en ensayos con 3D y 2C *in vitro*.

2.8.1 5-Fluorouracilo

FU es un análogo de uracilo con un átomo de flúor en el carbono C-5 en lugar de un átomo de hidrógeno (**Figura 2.12**). Fue sintetizado en 1957 por Heidelberger y cols. (Heidelberger et al., 1957) como agente antitumoral basándose en la observación de que en hepatomas de ratas la utilización de uracilo estaba alterado con respecto a tejidos sanos, indicando que el metabolismo del uracilo era una diana potencial de quimioterapia (Rutman et al., 1954). En la actualidad se sigue utilizando en terapia antitumoral sólo o en combinación con otros fármacos (Kabbinar et al., 2003, Kouroussis et al., 2002, Kretzschmar et al., 2000, Ohtsu et al., 2003, Wilke et al., 2000). Fue sintetizado para ser inhibidor suicida de la timidilato sintasa (TS). Esta enzima cataliza la conversión de deoxiuridina monofosfato (dUMP) en deoxitimidina monofosfato (dTTP) mediante la transferencia de un grupo metilo en el carbono C-5 del anillo de uracilo donado por el cofactor 5,10-metilentetrahidrofolato. TS puede unir el metabolito derivado de FU 5-fluorodeoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) en el sitio de unión de nucleótido de la enzima. Dado que el enlace carbono-flúor es mucho más fuerte que el enlace

carbono-hidrógeno, la presencia del átomo de F en el anillo de uracilo hace que se forme un complejo covalente ternario estable entre TS, FdUMP y el cofactor reducido ya que la enzima no es capaz de romper el enlace carbono-flúor (Santi et al., 1974, Sommer & Santi, 1974).

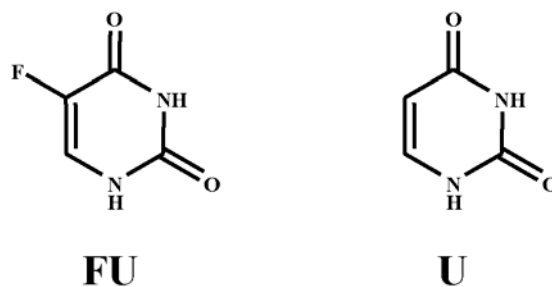


Figura 2.12. Estructura química de 5-fluorouracilo (FU) y uracilo (U).

2.8.1.1 Metabolismo del 5-fluorouracilo

La similitud estructural entre FU y el uracilo le permite entrar en las células utilizando los sistemas de entrada de bases pirimidinas e incorporarse en las rutas metabólicas (**Figura 2.13**). El principal mecanismo de transformación de FU es la conversión en 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP), bien directamente a partir del ororato (que se diferencia del uracilo por un grupo carboxilo unido en el carbono C-6 del anillo) por la ororato fosforribosiltransferasa (OPRT) utilizando fosforribosil pirofosfato como cofactor (PRPP), o indirectamente vía 5-fluorouridina (FUr) a través de la acción secuencial de uridín fosforilasa (UP) y uridín kinasa (UK) [revisado en (Longley et al., 2003, Parker & Cheng, 1990)]. FUMP se fosforila posteriormente por nucleótido kinasas para dar 5-fluorouridina-5'-difosfato (FUDP), el cual puede volver a fosforilarse para producir 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) o puede ser convertido en 5-fluorodeoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP) que puede, a su vez, ser fosforilado o defosforilado para producir 5-fluorodeuxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) o FdUMP, respectivamente, que como se indica en el apartado anterior, inhibe irreversiblemente la actividad de TS.

Tanto FdUTP como FUTP pueden ser incorporados en el DNA y RNA, respectivamente, por las polimerasas celulares. Se ha demostrado la presencia de FU en todas las especies celulares de RNA (Parker & Cheng, 1990). La presencia de FU en el RNA inhibe la maduración de RNAr (Ghoshal & Jacob, 1994, Ghoshal & Jacob, 1997, Kanamaru et al., 1986) y de RNAt (Randerath et al., 1983, Santi & Hardy, 1987) y altera el procesamiento y la estructura secundaria de los precursores de RNAm (Carrico & Glazer, 1979, Doong & Dolnick, 1988, Lenz et al., 1994, Patton, 1993, Samuelsson, 1991, Wu & Dolnick, 1993).

2.8.1.2 Efectos antivirales del 5-fluorouracilo

Durante la replicación viral, los fluoronucleótidos pueden incorporarse al material genético del virus ya sea DNA (Dragun et al., 1990) o RNA (Gordon & Staehelin, 1959, Munyon & Salzman, 1962) lo que le convierte en agente antiviral para un gran número de virus (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 El 5-fluorouracilo como antiviral de amplio espectro.

FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	EFFECTO ^a	REFERENCIA
<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus	Replicón del adenovirus humano tipo 5	↓ Título viral	(Wildner et al., 2003)
<i>Arenaviridae</i>	Arenavirus	Virus de la coriomeningitis linfocitaria de Ratón	↓ Título viral Causa mutación	(Grande-Perez et al., 2005, Grande-Pérez et al., 2002) (Ruiz-Jarabo et al., 2003) (de la Torre, 2005)
<i>Bunyaviridae</i>	Phlebovirus	Virus de la fiebre del valle del Rift	↓ Título viral Causa mutación	(Caplen et al., 1985)
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	Virus de la hepatitis de ratón	↓ Título viral Mutagénico	(Haspel et al., 1978)
<i>Flaviviridae</i>	Flavivirus	Virus de la encefalitis japonesa	Causa mutación	(Eastman & Blair, 1985)
<i>Herpesviridae</i>	Simplexvirus	Virus herpes simple	↓ Efecto citopático ↓ Título viral	(de Clercq, 1987) (Dragun et al., 1990)
	Cytomegalovirus	Citomegalovirus humano	↓ Título viral	(Suzuki et al., 1985)
<i>Leviviridae</i>	Levivirus	Bacteriofago R17	↓ Título viral ↓ Síntesis de RNA	(Graham & Kirk, 1965)
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenzavirus A	Virus de la gripe aviar	↓ Efecto citopático	(Dragun et al., 1990)
<i>Papillomaviridae</i>	Alfapapilomavirus	Papilomavirus Humano	Desaparición de la infección	(Niwa et al., 2003)
<i>Paramyxoviridae</i>	Morbillivirus	Peste Bovina	↓ Título viral ↓ Síntesis de RNA Causa mutación	(Ghosh et al., 1996)
	Avulavirus	Virus de la enfermedad de Newcastle	↓ Efecto citopático	(Dragun et al., 1990)
<i>Picornaviridae</i>	Aftovirus	Virus de la fiebre aftosa	↓ Efecto citopático ↓ Título viral ↓ Síntesis de RNA Causa mutación	(Pariente et al., 2001, Sierra et al., 2000) (Pariente et al., 2003, Pariente et al., 2001)
	Enterovirus	Virus de la poliometitis	↓ Título viral Causa mutación	(Cooper, 1964)
<i>Rhabdoviridae</i>	Vesiculovirus	Virus de la estomatitis vesicular	↓ Efecto citopático ↓ Título viral Causa mutación	(Pringle, 1970) (Holland et al., 1990) (Lee et al., 1997)

<i>Rhabdoviridae</i>	Tobamovirus	Virus del mosaico del tabaco	↓ Título viral Causa mutación	(Davern & Bonner, 1958) (Wittmann & Wittmann-Liebold, 1966) (Stachelin & Gordon, 1960)
<i>Togaviridae</i>	Alfavirus	Virus de la encefalomiелitis equina del oeste	↓ Efecto citopático	(Dragun et al., 1990)

Se muestra la familia, el género y la especie de los virus en los que se ha descrito efecto antiviral por 5-fluorouracilo o sus derivados.

^a Indica los efectos antivirales del 5-fluorouracilo o sus derivados descritos en la bibliografía para cada uno de los virus. “↓” indica disminución.

2.8.1.2.1 Mutagénesis inducida por halogenoderivados del uracilo

La capacidad mutagénica de los 5-halogenoderivados sobre el DNA es debida al menos a dos efectos, alteraciones en los niveles de dNTPs, y apareamientos de base incorrectos inducidos por la presencia del grupo halógeno de estos análogos de nucleótido (Hopkins & Goodman, 1980).

El FU es un inhibidor de la timidilato sintasa (**Figura 2.13**), reduciéndose sensiblemente los niveles celulares de dTTP, lo que afecta a la síntesis del DNA (Ghoshal & Jacob, 1997, Ingraham et al., 1982, Tyrsted, 1982). Esto provoca perturbaciones en los niveles del resto de desoxinucleótidos: disminuyen moderadamente los niveles de dGTP y dCTP (Ghoshal & Jacob, 1997, Kunz & Kohalmi, 1991, Parker & Cheng, 1990) y aumentan los de dUTP (Aherne et al., 1996, Mitrovski et al., 1994). En estas condiciones de niveles bajos de dTTP, tanto dUTP como FdUTP se incorporan al DNA celular (Parker & Cheng, 1990).

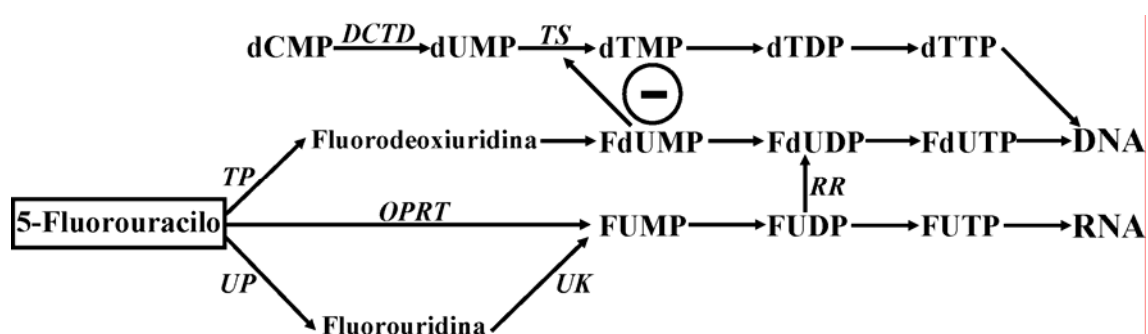


Figura 2.13. Metabolismo del 5-fluorouracilo. En letra cursiva aparecen las abreviaturas de las enzimas implicadas. Las abreviaturas son: TP, timidín fosforilasa; UP, uridín fosforilasa; OPRT, orotato fosforribosil transferasa; UK, uridín kinasa; RR, ribonucleótido reductasa; DCTD, dCMP deaminasa; TS, timidilato sintasa. (-) Inhibición.

La fuerte electronegatividad del átomo de flúor altera la densidad electrónica del anillo pirimidínico favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno con residuos de guanina, además de con adenina (**Figura 2.14**). En estudios bioquímicos realizados con DNA y otros halogenoderivados de uracilo se ha visto que este apareamiento tiene lugar tanto en el caso de halogenoderivado incorporado en el molde frente dGTP sustrato, como en el caso de guanina en el molde frente al halogenoderivado trifosfato sustrato (Lasken & Goodman, 1984, Yu et al., 1993). En consecuencia, los halogenoderivados del uracilo favorecen la aparición de transiciones durante la replicación del virus (**Figura 2.15**).

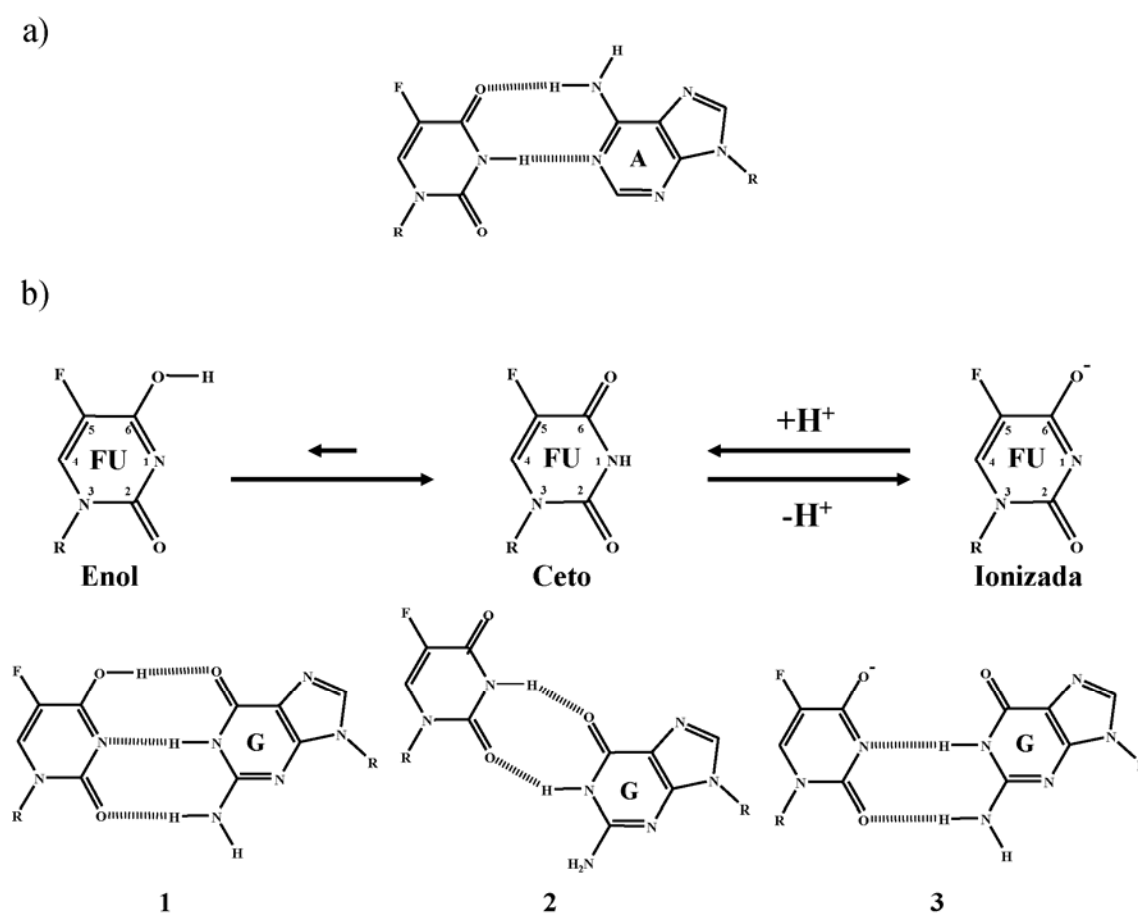


Figura 2.14. Promiscuidad en el apareamiento de bases por 5-fluorouridina. a) 5-fluorouridina aparea con A con una estructura de tipo Watson-Crick. b) La naturaleza del átomo de flúor permite teóricamente a la 5-fluorouridina varias posibilidades de apareamiento incorrecto con G. La alta electronegatividad del flúor altera la densidad electrónica del anillo de pirimidina induciendo eventualmente una carga positiva en la molécula, incrementando la probabilidad de perder un protón en la posición N-1, lo que conduce a la transformación de la forma cetónica (grupo =O en el C-6 del anillo) a la forma enólica (-O-H) en un proceso independiente de pH. Con esta forma puede aparearse con G con una estructura de tipo Watson-Crick (1). 5-fluorouridina en la forma cetónica (=O) puede aparearse con G con un apareamiento con estructura inestable denominada *wobble* o tambaleante (2). La forma cetónica (=O) puede pasar a la forma ionizada (O⁻) en un proceso dependiente de pH. 5-fluorouridina en la forma ionizada puede aparearse con G con una estructura de tipo Watson-Crick (3). En estructuras de DNA y RNA solamente se han observado apareamientos de tipo 2 y 3 (Champe & Benzer, 1962, Sahasrabudhe & Gmeiner, 1997, Sahasrabudhe et al., 1995, Sahasrabudhe et al., 1996, Sowers et al., 1988, Sowers et al., 1989, Yu et al., 1993). R, ribosa.

Estudios realizados en nuestro laboratorio con células BHK-21 demostraron que FU se convertía en FUTP en el interior de las células. Tras 10 h de exposición a FU, el nivel de UTP intracelular disminuyó 2,5 veces, alcanzando una disminución de 4,2 veces a las 38 h, mientras que no se observaba ninguna variación significativa en los niveles de GTP, CTP y ATP durante este periodo (Pariente et al., 2003). Mediante secuenciación de clones moleculares de poblaciones de VFA y de virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV) sometidas a tratamientos con FU en nuestro laboratorio, se ha determinado que las transiciones inducidas mayoritariamente en presencia de FU son $A \rightarrow G$ y $U \rightarrow C$ (Grande-Pérez et al., 2002, Pariente et al., 2001, Ruiz-Jarabo et al., 2003, Sierra, 2001, Sierra et al., 2000). Asimismo se observó un aumento en la complejidad del espectro de mutantes en las poblaciones mutagenizadas, medido tanto como incremento en la frecuencia de mutación como en la entropía normalizada de Shannon (apartado 4.17 de Materiales y Métodos), con respecto a poblaciones no tratadas (Pariente et al., 2001, Sierra et al., 2000).

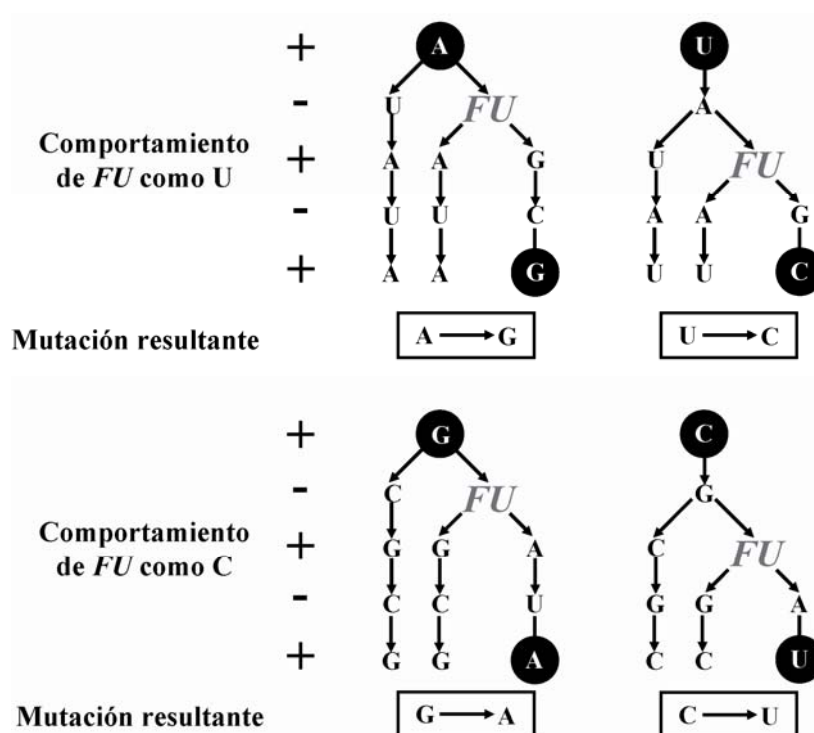


Figura 2.15. Mutagénesis inducida por apareamientos incorrectos ocasionados por FU. Esquema de las mutaciones que se inducen en el RNA viral debido al apareamiento incorrecto de FU con A ó G. A la izquierda se indica la hebra de RNA en que se encuentra cada nucleótido. Los nucleótidos presentes en cadena positiva (+) o cadena negativa (-) se representan con la letra correspondiente a la base nitrogenada; (A, adenosina; C, citosina; G, guanosina; U, uridina; FU, 5-fluorouridina). La base inicial y final de una vía mutagénica se indican de color blanco dentro de círculos negros y las mutaciones resultantes se resaltan mediante cuadros.

Nuestro laboratorio lleva mucho tiempo caracterizando las poblaciones de VFA surgidas durante el tratamiento con FU. Recientemente, en colaboración con el grupo de la Dra. Nuria Verdaguer se ha obtenido la estructura tridimensional de un complejo de 3D con un molde-cebador de RNA y FUMP incorporado en la posición +1 del iniciador. El FUMP establece enlaces de tipo Watson y Crick con el correspondiente AMP de la cadena molde formando un puente de hidrógeno adicional con la cadena lateral del residuo S304 (Ferrer-Orta et al., 2007).

En esta Tesis Doctoral se ha realizado el primer estudio *in vitro* con una RdRp encaminado a explicar las bases bioquímicas del carácter mutagénico e inhibitorio de FU para VFA.

2.8.2 Ribavirina

La ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-1*H*-1,2,4-triazol-3-carboxamida), también conocida como Virazol, es un análogo purínico antiviral de amplio espectro para muchos virus RNA y DNA tanto *in vivo* como *in vitro* (**Figura 2.16**). En la actualidad es utilizada para el tratamiento de infecciones por el virus de la hepatitis C (VHC), en combinación con interferon- α . (Cummings et al., 2001, Davis et al., 1998, Di Bisceglie et al., 2001, McHutchison et al., 1998) o PEG-interferon- α (interferón pegilado) (Mangia et al., 2005). Se emplea también para el tratamiento de infecciones por el virus respiratorio sincitial (Cooper et al., 2003, Hall et al., 1983) en forma de aerosol y el tratamiento de infecciones por virus Lassa (Andrei & De Clercq, 1993, McCormick et al., 1986). R es también un agente citostático.

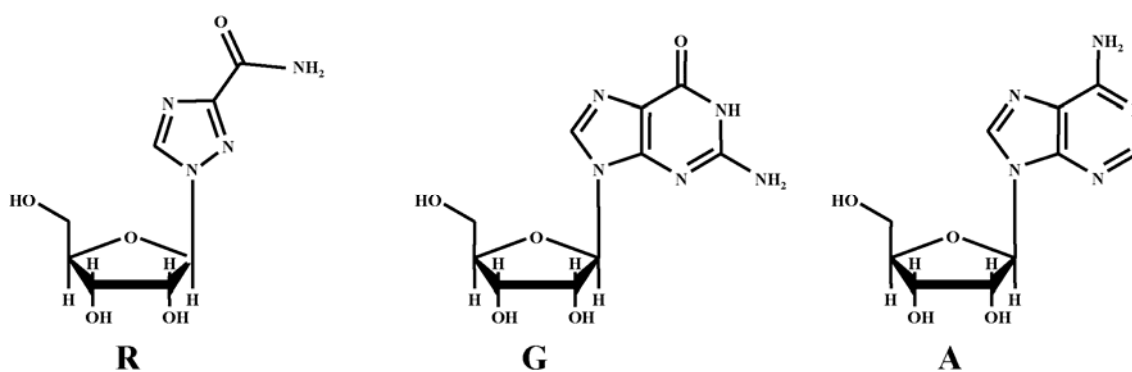


Figura 2.16. Estructura química de la ribavirina (R), guanosina (G) y adenosina (A).

2.8.2.1 Metabolismo de la ribavirina

La adenosina kinasa convierte R en ribavirina-5'-monofosfato (RMP) (Balzarini et al., 1993, Willis et al., 1978), que a su vez es convertida en ribavirina-5'-trifosfato (RTP) por acciones sucesivas de nucleósido mono- y di-fosfato kinasas (Gallois-Montbrun et al., 2003) (**Figura 2.17**). La fosforilación se produce rápidamente, de modo que tras pocas horas de tratamiento (con dosis farmacológicas relevantes, 10-100 μ M) los valores de RTP intracelulares alcanzan concentraciones parecidas (más de 100 μ M) a las de ATP y GTP en condiciones fisiológicas (Page & Connor, 1990). RTP es el principal metabolito intracelular de R en células de mamífero (Smee et al., 2001). El tratamiento con 500 μ M de R en el medio de cultivo de células BHK-21 persistentemente infectadas con VFA alcanzó el máximo valor de acumulación de RTP intracelular (1,3 mM) (Airaksinen et al., 2003). No se han detectado formas desoxinucleótido de R, sugiriendo que la ribavirina-5'-difosfato (RDP) no es un buen sustrato para la ribonucleótido reductasa (RR). Sin embargo, dado que los niveles intracelulares de desoxinucleótidos son inferiores a los de los ribonucleótidos es posible que los desoxinucleótidos de la ribavirina estén presentes en concentraciones difícilmente detectables. La ribavirina-5'-monofosfato (RMP) es un inhibidor competitivo de la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Balzarini et al., 1993, Lowe et al., 1977, Sintchak & Nimmesgern, 2000, Zimmerman & Deeprose, 1978). Como consecuencia de la competición entre RMP e IMP (inosín-5'-monofosfato, sustrato natural de IMPDH), los niveles intracelulares de GTP sufren reducciones de aproximadamente 5 veces en células tratadas con R (**Figura 2.17**).

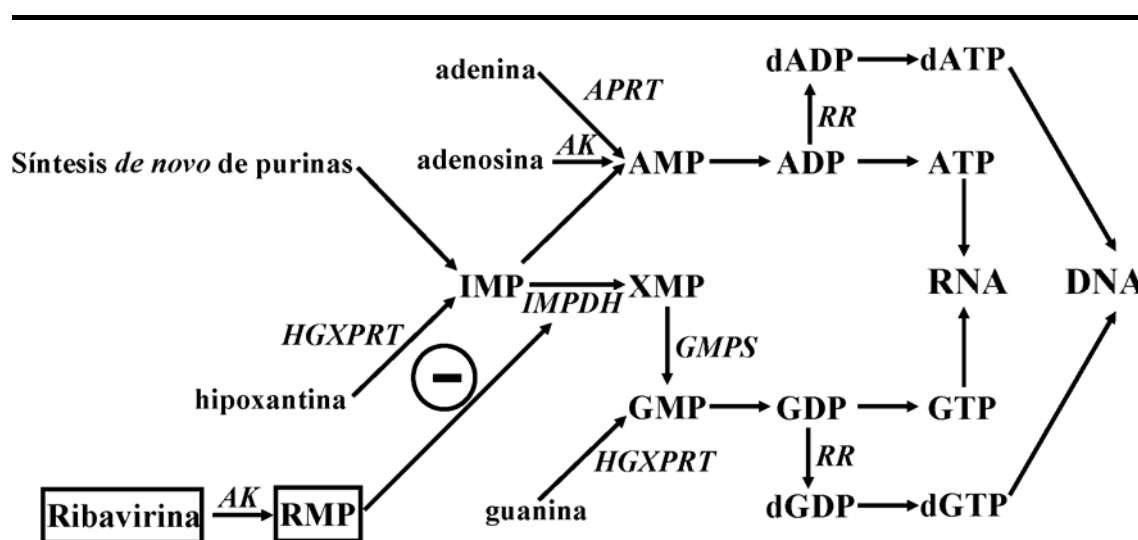


Figura 2.17. Metabolismo de ribavirina. En letra cursiva aparecen las abreviaturas de las enzimas implicadas. Las abreviaturas son: IMPDH, inosín monofosfato deshidrogenasa; RR, ribonucleótido reductasa; APRT, adenina fosforibotransferasa; AK, adenosina kinasa; HGXPRT, hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa; GMPS, GMP sintetasa; RMP, ribavirina-monofosfato; IMP, inosín-5'-monofosfato; XMP, xantina-5'-monofosfato. (-) Inhibición.

2.8.2.2 Efectos antivirales de la ribavirina

La ribavirina compite con la adenina y con la guanina, apareando tanto con la citosina como con el uracilo, y reduce la síntesis de DNA, RNA y proteínas en las células tratadas (Muller et al., 1977). Esto la convierte en agente antiviral para un gran número de virus (**Tabla 2.2**).

Tabla 2.2 La ribavirina como antiviral de amplio espectro.

FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	EFFECTO ^a	REFERENCIA
Arenaviridae	<i>Arenavirus</i>	Virus Junin	↓ Efecto citopático	(Rodriguez et al., 1986)
		Virus Lassa	↓ Infectividad	(Huggins, 1989)
		Virus Pinchinde	↓ Infectividad	(Smee et al., 1992)
		LCMV	↓ Título viral ↓ Infectividad	(Ruiz-Jarabo et al., 2003)
Deltaviridae	<i>Deltavirus</i>	Virus hepatitis delta	↓ Replicación	(Choi et al., 1989) (Chang et al., 2006)
Bornaviridae	<i>Bornavirus</i>	Virus de la enfermedad de Borna y He/80	↓ Síntesis de RNA	(Jordan et al., 1999)
Bunyaviridae	<i>Bunyavirus</i>	San Angelo	↓ Infectividad	(Smee et al., 1992)
	<i>Hantavirus</i>	Virus Hantaan	↓ Título viral ↓ Síntesis de proteínas Causa mutación	(Severson et al., 2003) (Sun et al., 2007) (Chung et al., 2007)
		Virus sin nombre	↓ Focos de virus	(Medina et al., 2007)
		Virus Seoul	↓ Focos de virus	(Murphy et al., 2001)
	<i>Nairovirus</i>	Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea- Congo	↓ Producción viral	(Watts et al., 1989)
	<i>Phlebovirus</i>	Virus de la fiebre siciliana Virus de la fiebre del valle de Rift	↓ Detección viral ↓ Efecto citopático	(Crance et al., 1997) (Garcia et al., 2001)
Flaviviridae	<i>Flavivirus</i>	Virus dengue 1,2 y 4	↓ Efecto citopático ↓ Replicación viral	(Crance et al., 2003) (Takhampunya et al., 2006)
		Virus de la encefalitis japonesa	↓ Efecto citopático	(Crance et al., 2003)
		Virus Langat	↓ Efecto citopático	(Crance et al., 2003)
		Virus Usutu	↓ Efecto citopático	(Crance et al., 2003)
		Virus Wesselsbron	↓ Efecto citopático	(Crance et al., 2003)
		Virus del Oeste del Nilo	↓ Efecto citopático ↓ infectividad Causa mutación ↓ replicación	(Crance et al., 2003) (Day et al., 2005) (Jordan et al., 2000)
		Virus de la fiebre amarilla	↓ Efecto citopático	(Crance et al., 2003)
	<i>Hepacivirus</i>	Virus zika	↓ Efecto citopático	(Crance et al., 2003)
		Virus GB-B	↓ Síntesis de RNA ↓ Infectividad Causa mutación	(Lanford et al., 2001)

Flaviviridae	<i>Hepacivirus</i>	VHC	↓Replicación Causa mutación	(Contreras et al., 2002) (Zhou et al., 2003) (Kanda et al., 2004) (Asahina et al., 2005)
Ortomixoviridae	<i>Influenzaviridae</i>	Virus de gripe A	↓ Efecto citopático	(Shigeta et al., 1997) (Wray et al., 1985b)
		Virus de gripe B	↓ Efecto citopático	(Wray et al., 1986)
Paramyxoviridae	<i>Metapneumovirus</i>	Metapneumovirus humano	↓ Efecto citopático.	(Wyde et al., 2003)
	<i>Morbillivirus</i>	Virus del sarampión	↓ Efecto citopático	(Wyde et al., 2003)
	<i>Pneumovirus</i>	Virus respiratorio sincitial bovino	↓ Replicación	(Bartzatt & Anderson, 1989)
		Virus respiratorio sincitial humano	↓ Efecto citopático	(Wyde et al., 2003)
Picornaviridae	<i>Aftovirus</i>	VFA	↓ Producción viral Causa mutación	(de la Torre et al., 1987) (Airaksinen et al., 2003) (Sierra et al., 2007)
	<i>Enterovirus</i>	PV	↓ Título viral ↓ Infectividad Causa mutación	(Crotty et al., 2001, Crotty et al., 2000)
Poxviridae	<i>Orthopoxvirus</i>	Virus vaccinia (de varios hospedadores)	↓ Formación de placas	(Smee et al., 2001)
Rhabdoviridae	<i>Novirhabdovirus</i>	Virus de la septicemia Hemorrágica vírica	↓ Síntesis de RNA	(Marroqui et al., 2007)
Retroviridae	<i>Lentivirus</i>	VIH Virus visna Maedi	↓ Replicación viral ↓ Título viral	(McCormick et al., 1984) (Frank et al., 1987)
Togaviridae	<i>Alphavirus</i>	Virus Chikungunya	↓ Efecto citopático ↓ Título viral	(Andrei & De Clercq, 1993)
		Virus del bosque de Semliki	↓ Título viral	(van Tiel et al., 1986)
Coronaviridae	<i>Coronavirus</i>	Virus del SARS	↓Replicación viral	(Morgenstern et al., 2005)

Tabla modificada a partir de (Vignuzzi et al., 2005). Se muestra la familia, el género y la especie de los virus en los que se ha descrito efecto antiviral por ribavirina

^a Indica todos los efecto antivirales de ribavirina descritos en la bibliografía para cada uno de los virus. “↓” indica disminución.

2.8.2.2.1 Inhibición de la inosín-monofosfato deshidrogenasa

Tras el descubrimiento de su actividad antiviral por ICN Pharmaceuticals (Sidwell et al., 1972) se propuso que el principal mecanismo de acción de la ribavirina (R) era la inhibición de la inosín-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) por la ribavirina-5'-monofosfato (RMP) (Streeter et al., 1973) (**Figura 2.17**). Debido a esta inhibición, se produce una bajada del nivel intracelular de nucleótidos de guanosina (GMP, GDP y GTP), lo que supone una disminución de la síntesis de RNA y del nivel de traducción de las proteínas virales (apartado 2.8.2.1). Los niveles de GTP se pueden restaurar, parcial o totalmente, por la adición de guanosina al medio de cultivo de las células, lo que puede alterar o no la actividad antiviral de R, dependiendo del

sistema viral (Airaksinen et al., 2003, Jordan et al., 1999, Scheidel & Stollar, 1991, Streeter et al., 1973, Sun et al., 2007, Wray et al., 1985b). El descenso en los niveles de GTP puede afectar a la replicación viral de dos formas. Por una parte, los niveles fisiológicos de GTP y dGTP son necesarios para la traducción, transcripción y replicación del material genético. Por tanto, el desbalance en las concentraciones relativas de nucleótidos causado por el tratamiento con R puede producir una inhibición de la replicación viral y explicar el amplio espectro de la ribavirina frente a muchos virus (**Tabla 2.2**). Por otra parte, el desbalance de concentraciones de nucleótidos puede favorecer que durante la síntesis del genoma viral las polimerasas sustituyan al GTP por otros nucleótidos, principalmente ATP, y/o favorezcan el empleo de RTP como sustrato anómalo. Como consecuencia, la replicación viral en presencia de R puede producir incrementos en la tasa de error tanto mediante mutagénesis directa (por incorporación de R; apartado 2.8.2.2.5) como indirecta (por desbalance en los niveles de nucleótidos intracelulares (Airaksinen et al., 2003, Stuyver et al., 2002).

2.8.2.2.2 Inhibición del capping

La ribavirina monofosfato (RMP) interfiere en la eficacia de *capping* (modificación post-transcripcional del RNA que consiste en la adición en el extremo 5' de un grupo guanilo por el enzima guanilil-transferasa) (Benarroch et al., 2004, Bougie & Bisaillon, 2004, Goswami et al., 1979, Wray et al., 1985a, Zhou et al., 2003). En VFA no hay traducción dependiente de *cap* (apartado 2.3.2.1), por lo que este efecto no puede intervenir en la actividad anti-VFA de R (Airaksinen et al., 2003). Dado que la inhibición de la formación del *cap* conlleva la supresión de eIF4E, que es un factor de iniciación de la traducción dependiente del *cap* cuya sobreexpresión está implicada en varios tumores humanos (De Benedetti & Graff, 2004), a R se le ha atribuido también un papel anticancerígeno (Kentsis et al., 2004).

2.8.2.2.3 Inhibición directa de la polimerasa viral

Se ha descrito la inhibición directa de algunas polimerasas víricas por la ribavirina trifosfato (RTP), en diversos sistemas virales tales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Toltzis et al., 1988), el virus de la gripe (Wray et al., 1985a), el virus de La Crosse (Cassidy & Patterson, 1989), el reovirus (Rankin et al., 1989), el VIH-1 (Fernandez-Larsson et al., 1989), el virus de la diarrea bovina (Stuyver et al., 2002), el virus GB-B (GBV-B) (Lanford et al., 2001) o el VHC (Maag et al., 2001, Vo et al., 2003).

2.8.2.2.4 Inmunomodulación

Varios estudios han sugerido que R tiene efectos inmunomoduladores (Feld & Hoofnagle, 2005, Herrmann et al., 2003, Parker, 2005) como por ejemplo la estimulación de la respuesta de células T durante la infección viral (Edell et al., 1998, Kamal et al., 2002, Peavy et al., 1981, Tam et al., 1999). R estimula la producción de citoquinas asociadas a linfocitos T-*helper 1* (Th1) (IL-2 e IFN- γ) y suprime la producción de citoquinas asociadas a linfocitos T-

helper 2 (Th2) (Hultgren et al., 1998, Ning et al., 1998, Tam et al., 1999). Durante el tratamiento combinado del VHC con IFN- α y R, se obtuvo una mejor respuesta de células T que con el tratamiento únicamente con IFN, apuntando a una acción sinérgica de ambas drogas (Cramp et al., 2000). Estos datos sugieren fuertemente que al menos parte de la actividad anti-VHC de R se debe a su capacidad inmunomoduladora.

2.8.2.2.5 Mutagénesis letal

Estudios experimentales más recientes han proporcionado evidencia de que uno de los principales mecanismos de la actividad antiviral de R para algunos virus se basa en su capacidad para ser incorporada por las RdRp durante la síntesis del RNA viral, implicando una actividad mutagénica directa (Amaraa et al., 2003, Crotty et al., 2001, Crotty et al., 2000, Day et al., 2005, Freistadt et al., 2004, Lanford et al., 2001, Maag et al., 2001, Severson et al., 2003, Sierra et al., 2007). El efecto mutagénico de R se produce por alteraciones en los niveles de NTPs debido a la inhibición de IMPDH por RMP y mutagénesis directa producida por apareamientos de base incorrectos inducidos por el derivado nucleótido trifosfato de R.

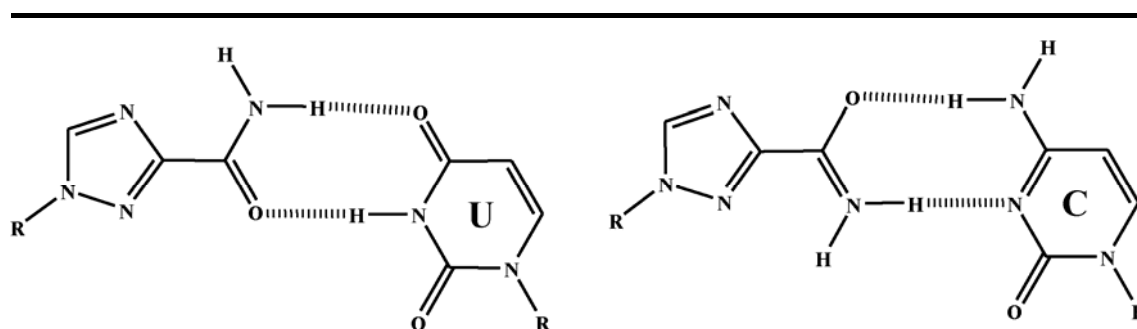


Figura 2.18. Promiscuidad en el apareamiento de bases por la ribavirina. La ribavirina puede adoptar 2 configuraciones por rotación del grupo carboxiamida. Esta rotación permite el establecimiento de puentes de hidrógeno tanto con U como con C. R, ribosa.

La inhibición de la IMPDH (apartado 2.8.2.2.1) (**Figura 2.17**) potencia el efecto mutagénico reduciendo la concentración del GTP intracelular, favoreciendo la incorporación de RMP en vez de GMP en el RNA producto (**Figura 2.18**). Trabajos de nuestro laboratorio con células persistentemente infectadas con VFA y tratadas con R, han indicado que la inhibición de IMPDH no es por sí sola suficiente para explicar el nivel mutagénico asociado a R. Se comparó el efecto que tenían R y el ácido micofenólico (MPA, un inhibidor de IMPDH no incorporable a ácidos nucleicos) en los niveles de nucleótidos intracelulares y en la complejidad de los espectros de mutantes del VFA. Los niveles de nucleótidos disminuyeron por igual tras tratamientos con R y MPA, pero R mostró mayor actividad antiviral, con valores de hasta 5 veces superiores en la frecuencia de mutación con respecto al tratamiento con MPA. La adición de guanosina al medio abolió el efecto mutágeno asociado a MPA, pero no el asociado a R

(Airaksinen et al., 2003). Recientemente, hemos constatado que R es un agente mutagénico para VFA también en infecciones líticas en células BHK-21 (Sierra et al., 2007). Estos resultados sugieren que el principal mecanismo de acción de R para VFA, es la mutagénesis letal (Airaksinen et al., 2003).

En algunos pacientes infectados con VHC tratados con R, se ha observado un aumento en la frecuencia de mutación en las proteínas NS5A, NS5B y NS3 que se ha correlacionado con una mejor respuesta al tratamiento (Asahina et al., 2005, Hofmann et al., 2007), lo que sugiere una acción mutagénica de la R *in vivo*. Un análisis teórico del efecto de R sobre niveles de VHC cuantificados *in vivo* ha sugerido que la principal acción de R consistiría en disminuir la infectividad de los viriones de VHC durante la terapia combinada con IFN- α , lo que fue interpretado por los autores como reflejo de una transición del VHC hacia catástrofe de error (Dixit et al., 2004). Este modelo para VHC es coherente con el modelo de defección letal propuesto para LCMV (Grande-Perez et al., 2005). En cambio, otros estudios no han revelado una acción mutagénica de R *in vivo* (Chevaliez et al., 2007, Schinkel et al., 2003) por lo que el mecanismo antiviral de R en infecciones de VHC es una cuestión abierta. [revisión en (Domingo & Gomez, 2007)].

La ribavirina puede aparearse tanto con la citosina como con el uracilo (**Figura 2.18**). El tipo de transiciones que se esperan tras la incorporación de la R por la polimerasa de un virus con RNA de polaridad positiva como el VFA se detallan en la **Figura 2.19**. Así cuando R se comporta como análogo de G, da lugar a las transiciones C \rightarrow U ó G \rightarrow A cuando se incorpora a la cadena negativa o positiva, respectivamente. Cuando R actúa como A y se incorpora a la cadena negativa, da lugar a las transiciones U \rightarrow C y cuando se incorpora a la cadena positiva, da lugar a transiciones A \rightarrow G. Estudios realizados en nuestro laboratorio tanto en infecciones persistentes como líticas en células BHK-21, han demostrado que el tratamiento con R provoca un aumento de la frecuencia de mutación de las transiciones de tipo C \rightarrow U y G \rightarrow A. Esto podría indicar por tanto que para VFA, la ribavirina se comporta preferencialmente como G durante la síntesis del RNA por 3D (Airaksinen et al., 2003, Sierra et al., 2007). Sin embargo, en colaboración con el Dr. Craig E. Cameron, el Dr. Armando Arias ha comprobado en ensayos *in vitro* con 3D de VFA, que R se incorpora con eficacia similar frente C y U (Arias et al., 2008).

2.8.2.3 Resistencia a ribavirina

Existen pocos casos descritos en la literatura de resistencia a R. Pases masivos de virus Sindbis en presencia de ácido micofenólico (MPA) seleccionaron variantes virales que mostraron resistencia a MPA y a R (Scheidel et al., 1987). El análisis genético identificó una mutación de resistencia en la región nsP1, presuntamente relacionada con la actividad guanilil transferasa. Además se ha identificado una mutación asociada con resistencia a R en pacientes crónicamente infectados con VHC y tratados con ribavirina. La mutación de resistencia mapea en el subdominio *thumb* de la polimerasa de VHC (NS5B) (Young et al., 2003). Por otro lado también se han encontrado mutaciones en la región NS5A que confieren resistencia a R en el replicón de VHC propagado en cultivos celulares (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005b).

En dos laboratorios distintos se seleccionó un variante de poliovirus (PV) con el cambio de aminoácido G64S en la polimerasa, al replicar el virus en presencia de cantidades crecientes de R (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003, Vignuzzi et al., 2006). Por aplicación de métodos genéticos y bioquímicos se observó una menor capacidad de la enzima mutante para usar RTP como sustrato y un aumento en la fidelidad de copia en relación con el virus *wt*. El mutante G64S de PV ha sido importante por 2 razones fundamentales:

i) Las RdRp son las responsables directas de la replicación con baja fidelidad y de la dinámica de cuasiespecies de los virus RNA. Por tanto, los mutantes de fidelidad son esenciales en el estudio de las bases moleculares de la fidelidad de copia del molde, así como en el diseño de drogas que permitan disminuir la fidelidad. También abren la posibilidad de explorar la influencia de las tasas de mutación en el comportamiento viral.

ii) Los estudios con el mutante de poliovirus G64S han demostrado que un espectro de mutantes amplio es esencial para la adaptación de los virus a un ambiente complejo (en este caso representado por un ratón susceptible) y que un mutante individual incapaz de alcanzar un órgano puede hacerlo cuando es complementado por un espectro de mutantes acompañante (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005a, Vignuzzi et al., 2006).

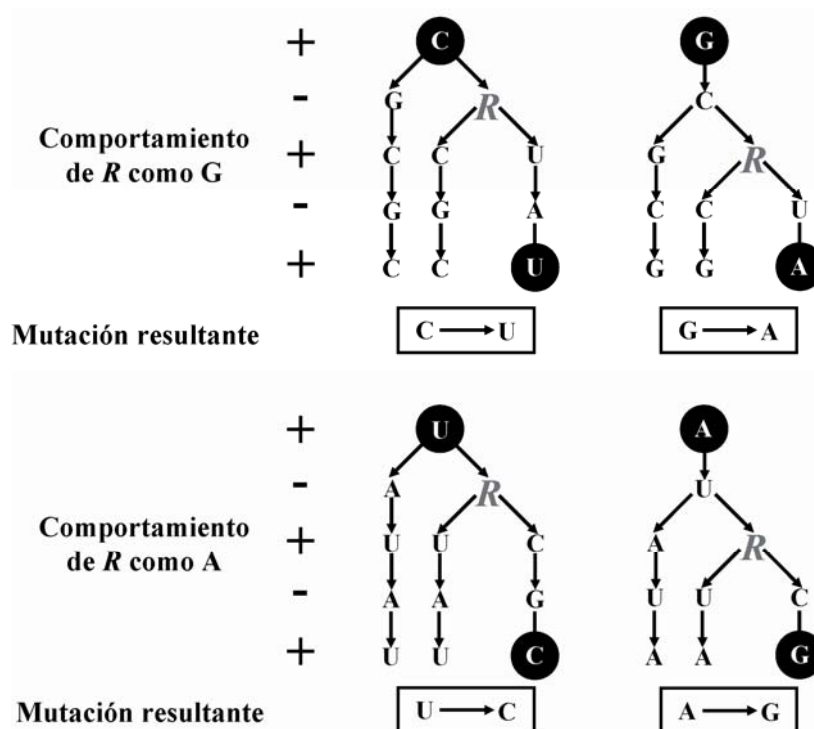


Figura 2.19. Mutagénesis inducida por apareamientos incorrectos ocasionados por R. Esquema de las mutaciones que se inducen en el RNA viral debido al apareamiento incorrecto de R con C ó U. A la izquierda se indica la hebra de RNA en que se encuentra cada nucleótido. Los nucleótidos presentes en cadena positiva (+) o cadena negativa (-) se representan con la letra correspondiente a la base nitrogenada; (A, adenosina; C, citosina; G, guanosina; U, uridina; R, ribavirina). La base inicial y final de una vía mutagénica se indican de color blanco dentro de círculos negros y las mutaciones resultantes se resaltan mediante cuadros.

Recientemente en nuestro laboratorio la Dra. Macarena Sierra, mediante un abordaje experimental similar, ha aislado un mutante de polimerasa de VFA con la sustitución M296I que presenta resistencia a R en cultivos celulares, mostrando un valor de *fitness* 4 veces superior al virus *wt* en presencia de la droga (Sierra et al., 2007). Se demostró que la polimerasa mutante incorporaba menos RMP en el RNA *in vitro*; sin embargo, mediante métodos genéticos no se observó un aumento de fidelidad, sino una leve disminución. Estos datos han sido constatados posteriormente mediante ensayos bioquímicos (Arias et al., 2008). Por tanto, en el caso de la polimerasa mutante de VFA, la resistencia a R no se debe a un aumento de fidelidad, sino a una resistencia específica a incorporar RMP, asociada a una pérdida de fidelidad. Ello demuestra la existencia de múltiples mecanismos de resistencia a R.

Con el fin de profundizar en el entendimiento de la resistencia de VFA a la presión ejercida por agentes mutagénicos, en esta Tesis Doctoral se han investigado los posibles mecanismos moleculares de resistencia a R durante la evolución de VFA sometido a un tratamiento prolongado con altas concentraciones de mutágeno.

3. Objetivos

3 Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

1. Caracterización de poblaciones de virus de la fiebre aftosa (VFA) sometidos a pases sucesivos en presencia de ribavirina (R) con el fin de favorecer la adaptación de estas poblaciones al mutágeno.
2. Estudio bioquímico de mutantes de polimerasa resistentes a R aparecidos en las poblaciones pasadas en presencia de la droga.
3. Caracterización de una población de VFA con 3D mutante resistente a la extinción por R.
4. Expresión, purificación y caracterización bioquímica de la proteína 2C de VFA. Estudio de un mutante de 2C surgido en una población de VFA tratada con R.
5. Estudio bioquímico de la actividad antiviral de 5-fluorouridina-5'-trifosfato para VFA.

4. Materiales y Métodos

4 Materiales y Métodos

4.1 Cultivo de células eucarióticas

Las células empleadas para las infecciones con el virus de la fiebre aftosa (VFA) son fibroblastos de riñón de hamster BHK (Stoker & Macpherson, 1964) que fueron clonadas por dilución límite (de la Torre et al., 1988). Las células se crecen como se describe en Domingo y cols. (Domingo et al., 1980): se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco & Freeman, 1959), con 5% de suero fetal de ternera (SBF; Gibco, BRL), aminoácidos no esenciales (Sigma), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma) y 0,00002% de parahidroxibenzoato de butilo (Sigma) usado como antimicótico. Las células se cultivan hasta confluencia a 37°C, 7% de CO₂ y 98% de humedad. Cuando están confluentes, se separan de la placa por tratamiento con tripsina-EDTA (Sigma) durante 2 minutos y se siembran a la dilución apropiada.

4.2 Virus utilizados

4.2.1 Variantes de VFA

- MARLS: VFA C-S8c1p213MARLS. Este virus es un clon mutante de escape al anticuerpo monoclonal (ACM) SD6, un ACM neutralizante que se une al bucle G-H de la proteína VP1 del VFA de serotipo C (Mateu et al., 1990), fue seleccionado a partir de la población C-S8c1p213 (clon C-S8c1 pasado 213 veces en células BHK-21) (Charpentier et al., 1996). MARLS presenta en total 18 cambios de aminoácido con respecto al virus C-S8c1 (**Tabla A.1** de Anexo). La eficacia biológica relativa (*fitness*) de este clon es de 25 veces la del clon C-S8c1 (García-Arriaza et al., 2005).
- MARLS-Ap9: (denominado a lo largo de esta Tesis Doctoral virus Ap9) es el virus MARLS pasado 9 veces en ausencia de cualquier droga.
- MARLS-Ap35: (denominado a lo largo de esta Tesis Doctoral virus Ap35) es un virus descrito anteriormente por la Dra. Macarena Sierra en nuestro laboratorio. Es el virus MARLS pasado 35 veces en ausencia de cualquier droga.
- MARLS-RAp35: (denominado a lo largo de esta Tesis Doctoral virus R-Ap35) es un virus descrito anteriormente por la Dra. Macarena Sierra en nuestro laboratorio. Es el virus MARLS pasado 35 veces en presencia de concentraciones crecientes de ribavirina (R) (200-800 µM) tal y como se describe en (Sierra et al., 2007). Presenta con respecto a MARLS el cambio de aminoácido M296I en la polimerasa (3D).
- MARLS-RAp45: (denominado a lo largo de esta Tesis Doctoral virus R-Ap45) Es el virus R-Ap35 pasado 10 veces en presencia de 800 µM R. Presenta con respecto a MARLS los cambios de aminoácido P44S y M296I en la 3D.
- MARLS-RAp60: (denominado a lo largo de esta Tesis Doctoral virus R-Ap60) Es el virus R-Ap45 pasado 15 veces en presencia de concentraciones crecientes (800-5000

μM) de R. Presenta con respecto a MARLS los cambios de aminoácido P44S, P169S y M296I en la 3D.

4.2.2 Clones infecciosos de VFA

- pMT28: es un clon infeccioso de C-S8c1 que contiene 35 residuos de citidina en el poli(C), 25 adenosinas en el poli(A) y se expresa bajo el promotor de la SP6 polimerasa. La secuencia se corresponde con la del genoma de C-S8c1 a excepción de 3 cambios sinónimos y 1 cambio en la región no codificante (Garcia-Arriaza et al., 2004).
- pMT28-3D(P44S): es un virus que contiene la sustitución P44S en la proteína 3D, en el contexto de pMT28.
- pMT28-3D(P169S): es un virus que contiene la sustitución P169S en la proteína 3D, en el contexto de pMT28.
- pMT28-3D(M296I): es un virus anteriormente descrito por nuestro laboratorio (Sierra et al., 2007) que proviene de un clon infeccioso construido por la Dra. Macarena Sierra que contiene la sustitución M296I en la proteína 3D, en el contexto de pMT28.
- pMT28-3D(2M): es un virus que contiene las sustituciones P44S y M296I en la proteína 3D, en el contexto de pMT28.
- pMT28-3D(3M): es un virus que contiene las sustituciones P44S, P169S y M296I en la proteína 3D, en el contexto de pMT28.
- pMT28-3D(4M): es un virus que contiene la sustitución I248T en la proteína 2C, y las sustituciones P44S, P169S y M296I en la proteína 3D, en el contexto de pMT28.
- pMT28-2C(I248T): es un virus que proviene de un clon infeccioso construido por Marta Sanz-Ramos en nuestro laboratorio que contiene la sustitución I248T en la proteína 2C, en el contexto de pMT28 (Sanz-Ramos et al., 2008).

Los distintos clones infecciosos mutantes se producen por mutagénesis dirigida, tal y como se describe en el apartado 4.12.

4.3 Agentes antivirales empleados

Los agentes antivirales empleados son 5-fluorouracilo (FU) (Sigma), ribavirina (R) (cedido por el Dr. Juan Carlos de la Torre) y el hidrocloreuro de guanidinio (GuH) (Sigma). Para preparar los medios correspondientes se parte de disoluciones de FU y GuH en DMEM (5 mg/ml y 50 mM, respectivamente) y de disoluciones de R en PBS (100 mM). Las disoluciones se esterilizan por filtración, se diluyen convenientemente en DMEM y se suplementan con 2% de SBF. Estos preparados se guardan a 4°C durante un periodo máximo de 15 días. La toxicidad celular de FU y GuH se ha estudiado en trabajos anteriores (Holland et al., 1990, Pariente et al., 2003, Pringle, 1970, Sierra et al., 2000). La toxicidad celular de R para concentraciones entre 0 y 800 μM se determinó en (Airaksinen et al., 2003). La toxicidad de R a concentraciones desde 1000 hasta 5000 μM se determina mediante tinción con azul tripano y el recuento de células

viabiles con cámara de Neubauer. La supervivencia celular es del 40% a las 48 h tras el tratamiento con 5000 μ M R.

Las monocapas celulares se preincuban en presencia del agente antiviral para permitir su absorción e incorporación a las vías metabólicas celulares. La concentración utilizada en la preincubación es la misma que se utiliza durante la infección. Las concentraciones de cada uno de los antivirales y los periodos de preincubación con las células BHK-21 son los siguientes:

- R: 800-5000 μ M; preincubación durante 6-8 horas.
- FU: 200, 300 y 400 μ g/ml; preincubación durante 6-8 horas. Sin preincubación en los experimentos de transfección por electroporación (apartado 4.15.2).
- GuH: 4 mM y 8 mM; sin preincubación.

4.4 Infecciones de monocapas de células BHK-21 por el VFA

4.4.1 Infecciones en medio líquido de células BHK-21 en ausencia de agentes antivirales

Los métodos de infección de células BHK-21 en medio líquido y los controles para asegurar ausencia de contaminaciones (mantenimiento de cultivos no infectados en paralelo, periódicos análisis por secuenciación para la identificación de virus, etc.) han sido descritos previamente (Baranowski et al., 1998, Domingo et al., 1980, Sierra et al., 2007). Las infecciones o pases seriados se realizan con 0,2 ml del sobrenadante de la infección previa (10% del volumen total) para infectar una monocapa de $2-4 \times 10^6$ células BHK-21. Si las condiciones de infección se modifican o/y son relevantes para la interpretación del experimento, éstas se indican en el texto (multiplicidad de infección, m.d.i; tiempo de recogida de virus, etc.) del correspondiente apartado de Resultados.

4.4.2 Infecciones en medio líquido de células BHK-21 en presencia de agentes antivirales

Las infecciones en presencia de agentes mutagénicos con los diferentes clones y poblaciones de VFA utilizados durante la Tesis Doctoral, se realizan en las condiciones descritas en el apartado 4.3. Se infectan las células dejando 1 hora de adsorción a 37°C; las monocapas celulares se lavan con 0,1 M tampón fosfato pH 6,0 y con DMEM para eliminar las partículas no absorbidas y se añade el medio de infección que contiene el agente antiviral. Los virus recogidos se titulan mediante infecciones de monocapas de células BHK-21 bajo medio semisólido (apartado 4.4.3).

4.4.3 Infecciones en medio semisólido de células BHK-21 (plaqueo) y titulación

Los títulos virales se determinan por plaqueo en células BKH-21 bajo medio de cultivo semisólido tal como se ha descrito previamente (Domingo et al., 1980, Sierra et al., 2007). Se

infectan $2-4 \times 10^6$ células BHK-21 con distintas diluciones de virus. Tras una hora de adsorción a 37 °C (7% de CO₂, 98% humedad) las monocapas se lavan 2 veces con DMEM y se añade agar semisólido al 0,5% (p/v), DMEM, 0,5% (p/v) agar, 2% de SBF y 1% de dietilaminoetil (DEAE)-dextrano. Tras 16 a 32 horas (normalmente 24 h) se fijan las células con formaldehído al 2% y se tiñen las monocapas fijadas con cristal violeta (2% cristal violeta en formaldehído al 2%). Todas las titulaciones para cuantificación de virus se realizan al menos por triplicado.

4.5 Extracción del RNA viral

4.5.1 Extracción del RNA viral total

La extracción del RNA viral se realiza mediante tratamiento con Trizol (Gibco) tal y como indica el proveedor (Sierra et al., 2007). El RNA extraído se precipita en 1 volumen de isopropanol y se lava con etanol al 70%. Finalmente el RNA se resuspende en 37,5 µl de TE (apartado 4.30) estéril, libre de nucleasas y se almacena a -70°C para su posterior uso.

4.5.2 Extracción del RNA viral intracelular

Para la extracción del RNA vírico intracelular, la monocapa de células BHK-21 se lava con tampón fosfato pH 6.0 y medio de cultivo con el fin de eliminar virus extracelular. Se extrae el RNA total intracelular de una monocapa confluyente de células en placa p35 (7×10^5 células) mediante la adición de 400 µl de Trizol que provoca que las células se rompan y se despeguen de la placa. La mezcla se transfiere a un tubo eppendorf. Se añaden 100 µl de cloroformo y se agita con vórtex. La recuperación, precipitación, resuspensión y almacenaje del RNA vírico se realizan como se describe en el punto 4.5.1.

4.6 Obtención de cDNA y amplificación por RT-PCR de RNA vírico

Para la obtención de cDNA de VFA, el RNA viral se copia mediante retrotranscripción, seguida de amplificación por PCR (RT-PCR). La reacción se realiza en 1 ó 2 pasos dependiendo del objeto de estudio para el cual se realiza.

Para determinar la secuencia consenso de poblaciones virales, la reacción se lleva a cabo en 1 único paso. Se emplea la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar AMV-RT (Promega) y la DNA polimerasa EHF (Expand High Fidelity) (Roche). La reacción se realiza en presencia del tampón suministrado para EHF (Roche).

Cuando el objetivo es la obtención de clones moleculares, la amplificación se realiza en 2 pasos. Se utiliza RT Reflectase (Active Motif) para la transcripción reversa. En la reacción de PCR se utiliza *Pfu* DNA-polimerasa (Promega) debido a que presenta mayor fidelidad de copia que otras DNA polimerasas gracias a la presencia de una actividad correctora de errores (Cline y cols. 1996). El empleo de *Pfu* DNA-polimerasa evita que las frecuencias de mutación determinadas para una población vírica se desvíen significativamente durante el proceso de

amplificación *in vitro* (Airaksinen et al., 2003, Arias et al., 2001). En todos los casos se siguen las instrucciones facilitadas por el fabricante.

Los productos amplificados se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio o SYBR-SAFE (Invitrogen Molecular Probes). Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de RNA por RT-PCR se detallan en la **Tabla 4.1**.

4.7 Purificación de fragmentos de PCR

Los productos de amplificación de PCR se purifican bien por extracción de banda de electroforesis en gel de agarosa o bien por filtración, dependiendo del objetivo perseguido.

La purificación de banda a partir de electroforesis en geles de agarosa se realiza en tampón TAE (apartado 4.30). El DNA de la banda deseada se purifica usando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA se cuantifica en un espectrofotómetro de amplio espectro (Nanodrop 1000) o mediante tinción con bromuro de etidio o SYBR SAFE en geles de agarosa y comparación de la intensidad de la banda con marcadores de concentración conocida.

La purificación por filtración, para eliminar oligonucleótidos y dNTPs no incorporados, se realiza con el kit *Montage kit pcr* (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 4.1 Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación, cuantificación y secuenciación del RNA y cDNA víricos.

REGIÓN ^a	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'→3') ^b	ORIENTACIÓN ^c	POSICIÓN ^d
Fragmento-S	SR3	TTGAAAGGGGGCGCTA GGGTC	S	1
	SD4HpaI	TGAAAGGCGGGTTTCGG GTG	A	367
5'UTR	NR2	TAAGTTTTACCGTCTGT CCCG	S	368
	NR1New	AACTCTCCTTGGTAACA AGGACC	S	742
	N2DNew	TGTTACCAAGGAGGAGT TCC	A	759
Proteasa-L	LRIL	CGGAGGTCGGCACCTTT CCTTTA	S	1002
	LD4	TCTCGGGCGAATTGTAG ACCCAG	A	1267
	LD1L	GCCTTCCACCCTTCATT GAGTGG	A	1619
VP4	4D1New	TTGTTCTGGGTGTTGGT TGTGTG	A	1835
VP2	EPF2	GAAGACCGCATTCTCAC TACCCG	S	1927
	2R1New	CTGGTCTAGAGACGC GCGTTCATC	S	2042
	2R2New	GATGGGCGACATCAGTG ACAGGG	S	2280
	JH2	GGGTTGATGAAGTGGTG GGG	A	2345

VP2	2R3New	CACGGTGCCCAACAGAT CAAAG	S	2471
VP3	JD5New	GCACGTACGCCACCATG TACCGAG	A	2926
	3R2New	CTTTGAGCTCCGGCTAC CTGTG	S	3171
VP1	NK26	GACCTTCACAAACCGG	A	3333
	AV1New	GGATTGGTTGTGTTGTT AAGTGC	A	3518
VP1	1R1L	ACACCGTGTGTTGGCTA CGGCG	S	3573
2A-2B	2BCNdeI5'	GAGTCCAACCCT <u>CATAT</u> <u>GTTCTTCTTCTCTGACGT</u> TAGGTCAAAC	S	3868
2B	2BR1	TTGGTGTCTGCTTTTGA GGAAC	S	3988
	2BD1	CGACAAACGTGCTGTCC AGAATCTC	A	4192
	2BR2	GAAGACCTTGAGAGAG CAGAG	S	4318
2B-2C	2CNdeI5'	AGAGCAGAGAAA <u>CATAT</u> <u>GAAAGCACGTGACATC</u> AACGACATC	S	4330
2C	2CD1	CTCTTCTGAGGCGATCC ATGC	A	4458
	2CR1	AGAGCGGGAACGTCCA TATTG	S	4580
	2CD2New	CAGTACCAAACAGAATC GGGG	A	4769
	2CR3	GCCTGACCCTGACCACT TCGAC	S	4770
	2CR2	GGCAAACCCTTCAGCAG TAAG	S	4924
	2CD3	CGCTCACGTGATGTCA AAGTG	A	5047
	mutCTu	AAATTGGACATCACCAA AGCACTTG	S	5074
	mutCTd	GGGTGTCTTCAAGTGCT TTGGTGATGTCC	A	5107
	mutqHu	GGCAATGTTTCACTACG ACTGTGCCC	S	5121
3A	3AD1	GAGTCGTGTACCATGCC CTC	A	5396
	3AD2	GCCTTCTGACCTGGAAG AGTTC	A	5699
	3AR3	GATGACGTGAACCTCTGA GCCCCG	S	5704
3C	3CD1	CATGACCATCTTTTGCA GGTCAG	A	6009
	3CR1	CCCCCGTCGTTGGCGTG ATTAAC	S	6308
	3CD2	CCAACATCAGCGTTGTT AATC	A	6344
	PolC-KpnI	GTTGGTACCCACTCTGC TGGAGGC	S	6502
3C-3D	NPol	GAACCGCACCC <u>CATGGG</u> GTTGATCGTTGATACCA GAG	S	6595
3D	5'3DP44S	CTAACAAGGACAGCCG TCTGAACGAAGGTG	S	6728
	3'3DP44S	CGTTCAGACGGCTGTCC TTGTTAGACAAGGCGG	A	6751
	3DR1	GAAACGCCGCGTGCA CTTATC	S	6984

3D	5'3DP169S	CGAAATTCGCAGCATG GAGAAAGTACGTGCCG G	S	7104
	3'3DP169S	CTTTCTCCATGCTGCGA ATTTCGTCTTCAGGAA GG	A	7126
	A3	CGTCGACAATGCGAGTC TTGCCG	A	7156
	B2New	CACTGCAGCGATGCCAT GAACATC	S	7351
	AV3	TTCATGGCATCGCTGCA GTGG	A	7370
	3D1	CTTGTTGCGGAACAGCC AGATG	A	7520
	AV2New	TGTGGAAGTGTCTTTTG AGGAAAG	A	7783
3D-3'UTR	C-Not-Pol	CCAATTGTGATGTTTGG <u>CGGCCGCTGCGTCGCCG</u> CACACGGCGTTC	A	8043
	pol 1-XbaI	AATCTAGATGTTTGGGG GATTATGCG	A	8060
3'UTR	R-end	TTTGGATTAAGGAAGCG GGAAAAGCCC	A	8115

^a Región genómica de VFA a la que corresponde el oligonucleótido (apartado 2.3.2.1 de Introducción).

^b Se especifica la secuencia del oligonucleótido. Las mutaciones respecto a VFA C-S8c1 están indicadas en negrita. Una secuencia subrayada y en cursiva indica la presencia de una diana de restricción.

^c Orientación del oligonucleótido iniciador: S significa “sentido” (de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA); A significa “antisentido” (de polaridad de la cadena negativa del VFA).

^d Se indica la posición en el genoma del VFA (Escarmís et al., 1999) del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido iniciador.

4.8 Secuenciación de DNA

La secuenciación de nucleótidos se efectúa mediante técnicas de secuenciación automática en los secuenciadores ABI373, ABI3730XL o ABI3700 (Applied Biosystems). La reacción se realiza con el kit *Big Dye Terminador V3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). El análisis de secuencias se lleva a cabo con el paquete *DNA Star 4.0* (Lasergene) mediante el análisis de cromatogramas. Cada secuencia se determina con al menos dos reacciones independientes de secuenciación. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación de DNA se detallan en la **Tabla 4.1**.

4.9 Cuantificación de moléculas de RNA vírico mediante amplificación por RT-PCR en tiempo real

La cuantificación de RNA vírico se realiza mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real con el aparato *LightCycler* (Roche). Se utiliza el kit *Light Cycler RNA Master SYBR Green I* (Roche) y se siguen las instrucciones facilitadas por el fabricante, optimizando la concentración de Mn^{2+} a 3 mM. Para la cuantificación de RNA vírico se amplifica la región codificante de 2C con los oligonucleótidos 2CD3 y 2CR2 (**Tabla 4.1**). El RNA de las muestras

se cuantifica por extrapolación de los valores en una curva patrón en paralelo con RNA de pMT28 (RNA transcrito a partir del plásmido pMT28) de concentración conocida.

4.10 Clonaje molecular para el análisis de cuasiespecies de VFA

Con objeto de asegurar un exceso de molde en los productos de amplificación que se clonan, solamente se utilizan las muestras para las cuales una amplificación con 1/100 del molde inicial es positiva. Se han seguido 3 estrategias de clonaje:

4.10.1 Clonaje en pET-28a3Dpol

Para el clonaje molecular de las poblaciones de VFA R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60, se transfiere cDNA de parte de la región codificante de la polimerasa (3D) al plásmido pET-28a3Dpol. Este plásmido, previamente descrito por nuestro laboratorio (Arias et al., 2005, Ferrer-Orta et al., 2004), es un derivado del plásmido comercial pET-28a (Novagen) que contiene la secuencia codificante de 3D de C-S8c1 en la que ha sido eliminada una diana de restricción *NcoI*. El cDNA viral se obtiene tal y como se describe en el apartado 4.6. Los oligonucleótidos empleados son NPol y C-Not-Pol. (Tabla 4.1). El producto de la RT-PCR se purifica como se describe en el apartado 4.7 y se digiere con las enzimas de restricción *HindIII* (posición 6667) y *NotI* (posición 8020). El producto de digestión purificado se liga con el plásmido pET-28a3Dpol previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, y tratado con fosfatasa alcalina para evitar religados.

Los productos de ligación se clonan en células competentes de *E. coli* DH5 α (Woodcock et al., 1988) y las colonias de bacterias se aíslan en placas Petri con medio LB (Sambrook & Russell, 2001), en presencia de kanamicina (70 μ g/ml, Sigma). El DNA plasmídico de las colonias se extrae mediante el kit *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se amplifican por PCR utilizando los oligonucleótidos NPol y C-Not-Pol, y se analizan mediante secuenciación (apartado 4.8).

4.10.2 Clonaje en pGEM-3Z Vector

Para el análisis de cuasiespecie de las poblaciones derivadas de pMT28, pMT28-3D(3M), pMT28-3D(4M) y pMT28-2C(I248T) (apartados 5.1 y 5.3 de Resultados) se clona la región genómica 3D de en el plásmido pGEM-3Z Vector (Promega). Se realiza una RT-PCR del RNA viral utilizando AMV-RT y EHF tal y como se describe en el apartado 4.6. Los oligonucleótidos empleados son PolC-KpnI y Pol 1-XbaI (Tabla 4.1) que introducen dianas de restricción para las enzimas *KpnI* (posición 6508) y *XbaI* (posición 8036). El producto de amplificación se purifica como se describe en el apartado 4.7 y posteriormente se digiere con estas mismas enzimas. El inserto se purifica y se liga en el vector pGEM-3Z Vector, previamente digerido con las mismas enzimas.

Los productos de ligación se clonan en células competentes *E. coli* DH5 α y se seleccionan las colonias positivas resistentes a Ampicilina (100 μ g/ml, Sigma). El DNA se extrae mediante el kit *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplifica por PCR utilizando los oligonucleótidos PolC-KpnI y Pol 1-XbaI, y se analiza mediante secuenciación (apartado 4.8).

4.10.3 Clonaje en pGEM-T Easy

Se utiliza esta estrategia de clonaje para el análisis de cuasiespecies virales de aquellas poblaciones en las que, debido a un tratamiento antiviral, se extrae poco material. Se amplifica la región codificante de la proteína 3D comprendida entre los nucleótidos 6984 y 7783 de la población de interés mediante RT-PCR, utilizando AMV RT y la DNA polimerasa EHF (Roche). Se emplean los oligonucleótidos 3DR1 y AV2new (Tabla 4.1.), tal y como se detalla en el apartado 4.6. Se purifica el fragmento obtenido como se describe en el apartado 4.7 y se lleva a cabo una reacción de *tailing* en un volumen final de 10 μ l empleando 5 μ l (25 ng) del DNA, 1 μ l del tampón de la enzima Ampli-Taq polimerasa (Perkin Elmer), 0,6 μ l de 25 mM MgCl₂, 2 μ l de 1 mM dATP (Invitrogen), 0,4 μ l de agua milli-Q estéril y 5 unidades de Ampli-Taq polimerasa (Perkin Elmer) en 1 μ l. La mezcla se incuba a 70° C durante 30 minutos. El producto de la reacción de *tailing* se liga al vector pGEM-T Easy (Promega).

La transformación en *E. coli* DH5 α , así como el análisis del DNA de las colonias transformantes, se realiza como se describe en el apartado anterior, utilizando durante la amplificación de PCR los oligonucleótidos 3DR1 y AV2new.

4.11 Clonaje molecular para la obtención de un RNA correspondiente a la región *cre* (OriI) de VFA

Se amplifica la región genómica de VFA comprendida entre los nucleótidos 529 y 613 mediante RT-PCR utilizando la AMV RT y DNA polimerasa EHF según se detalla en el apartado 4.6, empleando como molde el clon infeccioso pMT28 y los oligonucleótidos CreEco5', con la misma polaridad que el genoma de VFA y que introduce por mutagénesis una diana para la enzima de restricción *Eco*RI entre las posiciones 534 y 539 (CGCACGAATTCGCCGTCGCTTGAGGAAGAC) y CreXma3', con la misma polaridad que la cadena negativa de VFA y que introduce por mutagénesis una diana para *Xma*I entre las posiciones 602 y 607 (AAGTTGCCCAGGTTGTGTCAGTTGGGGAAACC).

Se purifica el fragmento obtenido tras la RT-PCR como se describe en el apartado 4.7 y se digiere con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xma*I (New England Biolabs). El producto se purifica y se liga en el plásmido pGEM-3Z Vector (Promega), previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denomina "pGEM-Cre".

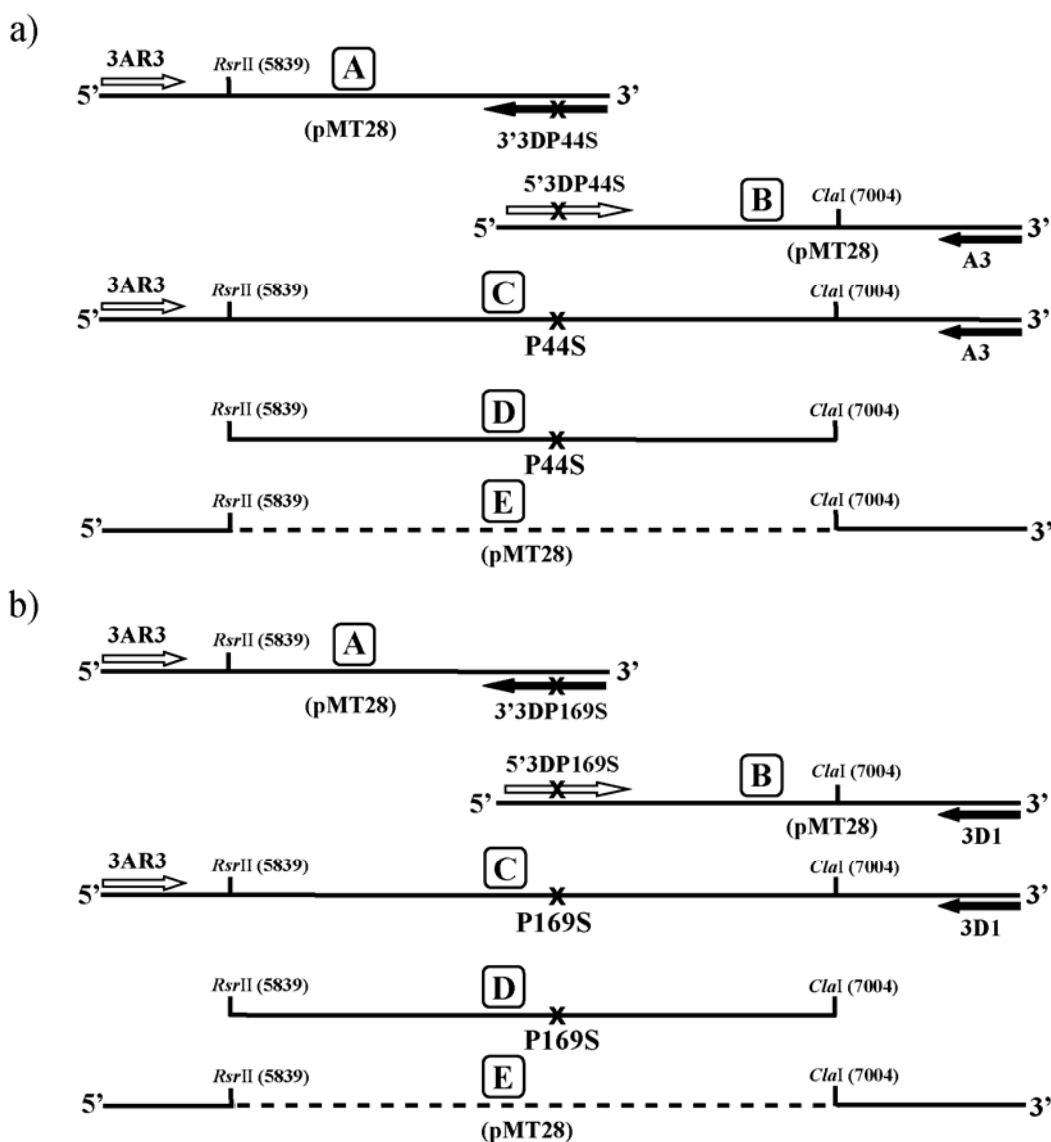
Para la obtención de RNA *cre* de VFA, el plásmido pGEM-Cre se lineariza por digestión con *Sma*I y se purifica utilizando el kit *Wizard PCR Preps DNA purification resin* (Promega). Se realiza una transcripción *in vitro* utilizando la enzima T7 RNA polimerasa (Fermentas), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras la transcripción, el plásmido es

eliminado con DNasa RQ1 (Promega) y el RNA se purifica mediante *Mini Quick Spin RNA Columns* (Roche). La concentración de RNA se calcula mediante espectrofotometría.

4.12 Obtención de clones infecciosos mutantes de VFA

Los distintos clones infecciosos utilizados durante esta Tesis Doctoral se obtienen mediante PCR mutagénica y clonaje molecular. Se han construido los mutantes pMT28-3D(P44S), pMT28-3D(P169S), pMT28-3D(2M), pMT28-3D(3M) y pMT28-3D(4M). El pMT28-3D(M296I) es un clon infeccioso previamente construido por la Dra. Macarena Sierra en nuestro laboratorio (Sierra et al., 2007). El pMT28-2C(I248T) es un clon infeccioso construido en nuestro laboratorio por Marta Sanz-Ramos (Sanz-Ramos et al., 2008).

Los moldes de DNA, los oligonucleótidos y las enzimas de restricción empleadas, así como la estrategia de amplificación utilizada en cada caso para la obtención de los distintos clones infecciosos descritos en el apartado 4.2.2 se detallan en la **Figura 4.1**.



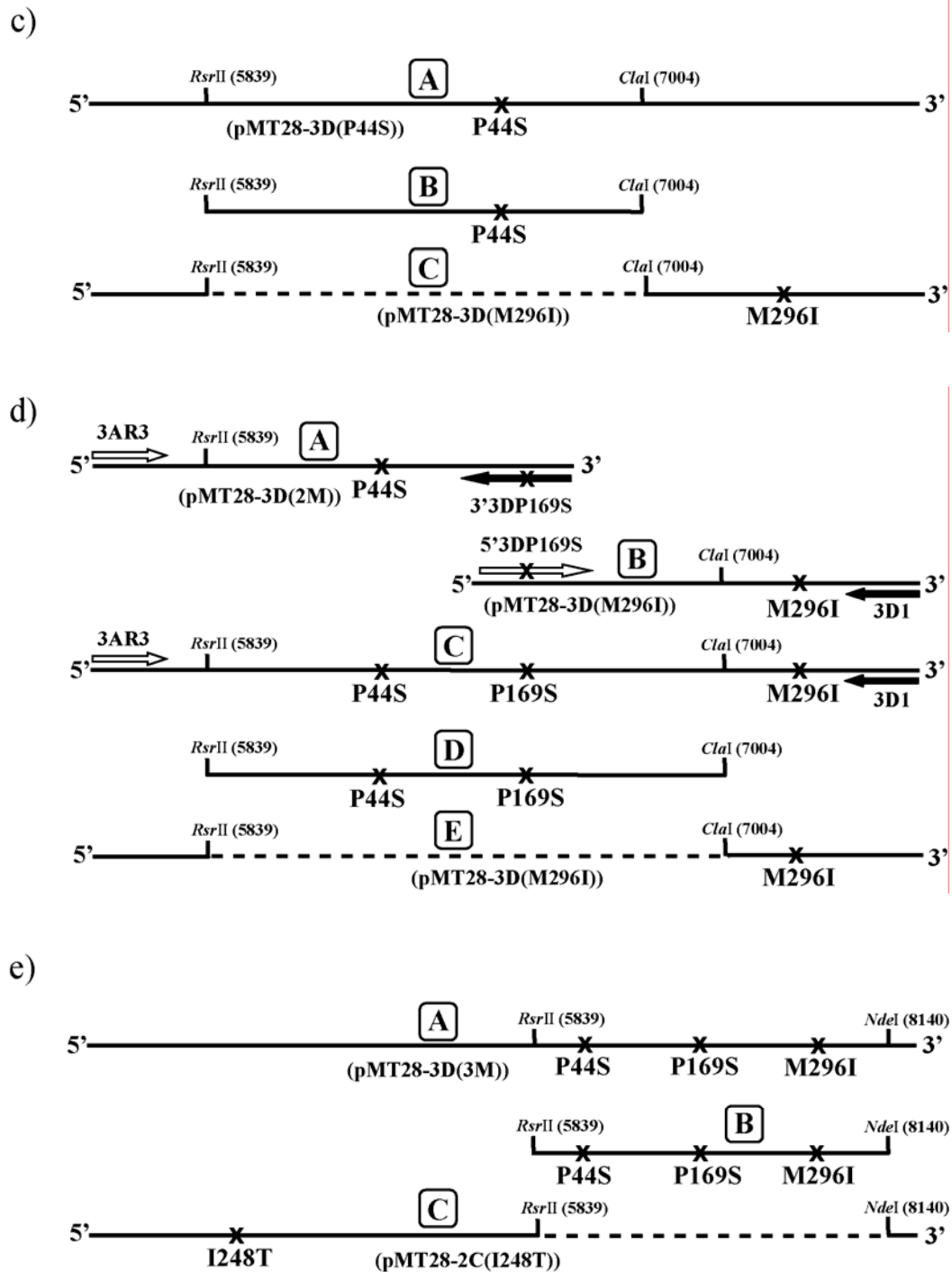


Figura 4.1 Representación esquemática de la estrategia de clonaje de los clones infecciosos. Las líneas negras horizontales representan plásmidos. El nombre de los plásmidos utilizados como molde de la reacción de PCR o como inserto de la reacción de ligación está escrito entre paréntesis. Las líneas negras horizontales discontinuas entre dos dianas de restricción indican que esa región se ha eliminado por digestión con enzimas de restricción. Los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR (**Tabla 4.1**) se representan como flechas blancas cuando la orientación es la misma que el RNA genómico de VFA, y como flechas negras cuando la orientación es la misma que la de la cadena negativa de VFA. Las mutaciones originadas se representan con una cruz. Los cambios de aminoácido codificados por las distintas mutaciones introducidas se representan debajo de la cruz correspondiente. Las enzimas de restricción utilizadas en cada caso se representan con letra cursiva, indicándose la posición genómica donde corta cada una ellas. **a)** Para la construcción del pMT28-3D(P44S) se realizan 2 amplificaciones con los oligonucleótidos

indicados, obteniéndose los fragmentos A y B. Los productos finales de PCR son recombinados en una reacción de PCR *shuffling*, utilizando cantidades equimolares de dichos fragmentos (A y B) y los oligonucleótidos externos indicados, obteniéndose el fragmento C. Las amplificaciones de la región 3D, que incluyen las mutaciones adecuadas, se realizan con *Pfu* DNA-polimerasa. El fragmento C de DNA obtenido se digiere con las enzimas indicadas (D), se purifica como se describe en el apartado 4.7 y se liga al plásmido pMT28, digerido con las mismas enzimas que el producto de PCR (E), empleando T4 DNA ligasa (Roche); previamente se elimina el grupo 5' fosfato de los extremos del vector por tratamiento con fosfatasa alcalina (USB). **b)** Para la obtención del clon infeccioso pMT28-3D(P169S) se realizan 2 amplificaciones con los oligonucleótidos indicados, obteniéndose los fragmentos A y B. Estos productos de PCR son recombinados en una reacción de PCR *shuffling* obteniéndose el fragmento C, se corta con las enzimas de restricción indicadas (D) y se liga al plásmido pMT28, digerido con las mismas enzimas de restricción (E), tal y como se describe en a). **c)** Para la obtención del plásmido pMT28-3D(2M), se digiere el plásmido pMT28-3D(P44S) (A) con las enzimas indicadas, el inserto obtenido (B) se purifica como se describe en el apartado 4.7 y se liga al plásmido pMT28-3D(M296I) digerido con las mismas enzimas (C) tal y como se describe en a). **d)** Para la obtención del clon infeccioso pMT28-3D(3M) se realizan 2 amplificaciones por PCR con los oligonucleótidos indicados, se obtienen los fragmentos A y B, y se recombinan en una reacción de PCR *shuffling* para obtener el fragmento C. Este fragmento se digiere con las enzimas de restricción indicadas (D) y se liga al plásmido pMT28-3D(M296I), cortado con las mismas enzimas de restricción (E), tal y como se describe en a). **e)** Para la construcción del clon infeccioso pMT28-3D(4M), el plásmido pMT28-3D(3M) (A) se trata con las enzimas de restricción indicadas, el inserto obtenido (B) se purifica como se describe en el apartado 4.7 y se liga al plásmido pMT28-2C(I248T), digerido con las mismas dianas de restricción (C), como se describe en a).

4.13 Determinación de la eficacia biológica relativa (*fitness*) de las distintas poblaciones virales estudiadas

La eficacia biológica relativa de los distintos mutantes y/o poblaciones de VFA, se determina mediante experimentos de competición en pases seriados entre el virus problema y un virus de referencia (Holland et al., 1991).

Se coinfectan células BHK-21 a una m.d.i. de 0,1 UFPs por célula (2-4 x 10⁶ células infectadas con un total de 4 x 10⁵ UFPs en el primer pase) con mezclas del virus problema y el virus de referencia en proporción 1:1 y en las condiciones descritas en el apartado 4.4.1 ó 4.4.2, dependiendo si la determinación de *fitness* se realiza en ausencia o presencia de agentes antivirales. Cuando el efecto citopático es completo, se recoge el sobrenadante de infección. Para evitar que la m.d.i. sea superior a 1, se diluye 10 veces y se infecta una nueva monocapa de células BHK-21. El proceso se repite un total de 4 infecciones sucesivas.

Las coinfecciones realizadas en presencia de 5000 µM R se recogen a las 36 h aún cuando el efecto citopático no sea completo. En este caso, no se realiza la dilución del sobrenadante entre los distintos pases.

La cuantificación de la proporción de los dos virus competidores en cada pase se realiza mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (descrita en el apartado 4.9), utilizando distintas parejas de oligonucleótidos que permiten discriminar entre las secuencias en que difieren las 2 poblaciones presentes durante la coinfección. Las condiciones utilizadas para la amplificación garantizan una discriminación de al menos 30 veces del virus problema con respecto al competidor.

La representación del logaritmo de la proporción de los dos genomas que compiten frente al número de pases da el vector de eficacia biológica (Duarte et al., 1992, Escarmís et al., 1996, Escarmís et al., 1999, Holland et al., 1991). El antilogaritmo de la pendiente es el valor numérico de eficacia biológica de un virus con respecto a otro.

4.13.1 Determinación de la eficacia biológica relativa de las poblaciones virales R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60 con respecto a MARLS

La cuantificación de la proporción de dos virus en competición se realiza mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (como se describe en el apartado 4.9). La mutación G7497A está presente sólo en los genomas de VFA que han sido pasados en presencia de R (R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60) y corresponde a la sustitución de aminoácido M296I en 3D. Se utilizan los oligonucleótidos y condiciones de hibridación previamente descritos por la Dr. Macarena Sierra en nuestro laboratorio (Sierra et al., 2007) (**Tabla 4.2**).

La cuantificación de RNA con la mutación G7497A de cada uno de los pases de los distintas poblaciones virales se determina por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una recta patrón realizada en paralelo con RNA extraído a partir de una infección en células BHK-21 con R-Ap35, como se describe en el apartado 4.5.1. Para la cuantificación de virus que mantuvieran la secuencia original (G7497) se procede de la misma forma a excepción de que la curva patrón se realiza a partir de RNA extraído de MARLS.

Tabla 4.2 Condiciones de la cuantificación a tiempo real de RNA de VFA R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60.

OLIGONUCLEÓTIDO	POBLACIÓN ^a	SECUENCIA ^b	ORIENTACIÓN ^c	T° ^d	POSICIÓN ^e
MK WT	MARLS	GGAACAGCCAG ATGGCAT	A	72	7512
MK RES	R-Ap35 R-Ap45 R-Ap60	GGAACAGCCAG ATGGTAT	A	68	7512
3DR4	n.d.	ACTCGCATTGTC GACGTTTT	S	n.r.	7141

^a Indica la población viral que es reconocida específicamente por el oligonucleótido utilizado. “n.d.” indica que el oligonucleótido no discrimina entre ninguna de las poblaciones presentes en la infección y que se utiliza como pareja para la reacción de amplificación.

^b Se especifica la secuencia del oligonucleótido. En negrita se indica la posición de la mutación que permite discriminar entre las poblaciones presentes en la infección.

^c Orientación del oligonucleótido iniciador: S significa “sentido” (de polaridad positiva); A significa “antisentido” (de polaridad de la cadena negativa de VFA).

^d Temperatura de hibridación del oligonucleótido a la cual se obtiene una amplificación específica (al menos 30 veces de diferencia) de la población indicada en ^a, con respecto a la población competidora. “n.r.” indica que se trata de un oligonucleótido que no reconoce específicamente las poblaciones presentes en la infección y que se utiliza como pareja de la reacción de amplificación. La temperatura de hibridación durante la reacción de amplificación está

determinada siempre por los oligonucleótidos que discriminan entre las distintas poblaciones presentes durante la infección.

4.13.2 Determinación de la eficacia biológica relativa de poblaciones virales mutantes derivadas de clones infecciosos

La cuantificación de la proporción de los 2 virus competidores en cada pase se realiza mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real como se ha descrito en el apartado anterior.

Para la determinación de la eficacia biológica relativa de pMT28-3D(P44S), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M) con respecto a pMT28, se han diseñado oligonucleótidos capaces de discriminar entre el codón que codifica en pMT28 el aminoácido P44 en 3D ($_{6739}$ CCA $_{6741}$) y el codón que codifica la sustitución P44S ($_{6739}$ ACG $_{6741}$) en pMT28-3D(P44S), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M) (Tabla 4.3.1). La cuantificación de RNA con el codón que codifica la sustitución P44S de cada uno de los pases se determina como se ha indicado en el apartado 4.13.1, utilizando como recta patrón RNA purificado de una transcripción de pMT28-3D(P44S).

Tabla 4.3.1 Oligonucleótidos y condiciones para la cuantificación de RNA de pMT28, pMT28-3D(P44S), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M).

OLIGONUCLEÓTIDO	POBLACIÓN ^a	SECUENCIA ^b	ORIENTACIÓN ^c	T ^o ^d	POSICIÓN ^e
P44	pMT28	GCCTTGCTCT AACAAGGAC CCA	S	65	6720
S44	pMT28-2C(P44S) pMT28-3D(2M) pMT28-3D(3M)	GCCTTGCTCT AACAAGGAC AGC	S	65	6720
Ncopol3	n.d.	GTGTCTGGC TCCATAGCG TCGAGTC	A	n.r.	6953

Tabla 4.3.2 Oligonucleótidos y condiciones para la cuantificación de RNA de pMT28, y pMT28-3D(P169S), y de pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M).

OLIGONUCLEÓTIDO	POBLACIÓN ^a	SECUENCIA ^b	ORIENTACIÓN ^c	T ^o ^d	POSICIÓN ^e
P169	pMT28 pMT28-3D(2M)	CCTGAAGGA CGAAATTCG CCCG	S	63	7095
S169	pMT28-3D(P169S) pMT28-3D(3M)	CCTGAAGGA CGAAATTCG CAGC	S	63	7095
AV3	n.d.	TTCATGGCA TCGCTGCAG TGG	A	n.r.	7370

Tabla 4.3.3 Oligonucleótidos y condiciones para la cuantificación de RNA de pMT28, pMT28-2C(I248T) y pMT28-3D(4M).

OLIGONUCLEÓTIDO	POBLACIÓN ^a	SECUENCIA ^b	ORIENTACIÓN ^c	T ^o ^d	POSICIÓN ^e
I248(-1)	pMT28	ACAACAAAT TGGACATCA TC	S	65	5069
T248(-1)	pMT28-2C(I248T) pMT28-3D(4M)	ACAACAAAT TGGACATCA CC	S	63	5069
2CD4	n.d.	ACACAGATT TTTGGGAAG GT	A	n.r.	5326

^a Indica la población que reconoce específicamente el oligonucleótido utilizado. “n.d.” indica que el oligonucleótido no discrimina entre ninguna de las poblaciones presentes en la infección y que se utiliza como pareja para la reacción de amplificación.

^b Se especifica la secuencia del oligonucleótido. En negrita se indica la posición de la mutación que permite discriminar entre las poblaciones presentes en la infección.

^c Orientación del oligonucleótido iniciador: S significa “sentido” (de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA); A significa “antisentido” (de la polaridad de la cadena negativa del VFA).

^d Temperatura de hibridación del oligonucleótido a la cual se discrimina la secuencia de interés en al menos 30 veces con respecto a la secuencia alternativa. “n.r.” indica que se trata de un oligonucleótido que no reconoce específicamente las poblaciones presentes en la infección y que se utiliza como pareja de la reacción de amplificación. La temperatura de hibridación durante la reacción de amplificación está determinada siempre por los oligonucleótidos que discriminan entre las distintas poblaciones presentes durante la infección.

Para la determinación de la eficacia relativa de pMT28-3D(P169S) con respecto a pMT28, se diseñan oligonucleótidos capaces de discriminar entre el codón que codifica P169 en la polimerasa 3D de pMT28 (₇₁₁₄CCG₇₁₁₆) y el codón que codifica S169 en pMT28-3D(P169S) (₇₁₁₄ACG₇₁₁₆), (**Tabla 4.3.2**). La cuantificación de RNA de estos virus se determina como se explica en el apartado 4.13.1, utilizando como recta patrón RNA de una transcripción de pMT28 y pMT28-3D(P169S).

Para la determinación de la eficacia biológica relativa de pMT28-3D(3M) respecto a pMT28-3D(2M) se utilizan los mismos oligonucleótidos descritos en el párrafo anterior, empleando las condiciones indicadas en la **Tabla 4.3.2**. Como recta patrón se utiliza RNA transcrito de pMT28 y pMT28-3D(3M).

La eficacia biológica relativa de pMT28-3D(M296I) con respecto a pMT28 se determina con los mismos oligonucleótidos descritos en el apartado 4.13.1 y las condiciones de cuantificación son las mismas que se muestran en la **Tabla 4.2**.

Para la determinación de la eficacia biológica relativa de pMT28-2C(I248T) y pMT28-3D(4M) con respecto a pMT28, se diseñan oligonucleótidos capaces de discriminar entre las secuencias que difieren en la posición 5087 (**Tabla 4.3.3**). La cuantificación de RNA con la mutación U5087C de cada uno de los países se determinó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una recta patrón realizada con RNA de pMT28-2C(I248T). Para la

cuantificación de virus que mantuvieran la secuencia original (U5087) se procede de la misma forma a excepción de que la curva patrón se realiza a partir de RNA de pMT28.

4.14 Transcripción de clones infecciosos

El DNA de los clones infecciosos se lineariza por digestión con *NdeI*. El plásmido digerido se purifica utilizando el kit *Wizard PCR Preps DNA purification resin* (Promega). La reacción de transcripción se lleva a cabo utilizando *SP6* RNA polimerasa (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de RNA obtenida se estima mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con *SYBR safe* (Invitrogen) por comparación con cantidades conocidas de RNA ribosómico.

4.15 Transfección de RNA viral procedente de la transcripción de clones infecciosos

4.15.1 Transfección mediante lipofección

Se transfectan células BHK-21 subconfluentes (70% confluentes) con RNA viral (0,1-1 µg) y lipofectina (Gibco) (Sambrook & Russell, 2001). Los virus, recogidos del sobrenadante de las células a las 72 horas post-transfección, se multiplican mediante 2 pases en células BHK-21 ($2-4 \times 10^6$ células). Se extrae RNA del virus procedente del último pase y la región codificante de la proteína 3D ó 2C, según corresponda, es amplificada y secuenciada para comprobar la presencia de las mutaciones introducidas en el clon infeccioso.

4.15.2 Transfección mediante electroporación

Para la transfección por electroporación se levantan y resuspenden las células por tratamiento con tripsina, se lavan y se resuspenden en PBS a 4°C, a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml; 400 µl de esta suspensión se mezclan con 50 µl de RNA transcrito, a distinta concentración dependiendo del experimento, y la mezcla se transfiere a un cubeta de electroporación de 2 mm (Bio-Rad). La electroporación se realiza a 4°C mediante 2 pulsos consecutivos de 1,5 kV a 25 µF usando un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad). Como control, se electroporan células BHK-21 con 50 µl de mezcla de transcripción en ausencia de RNA. Posteriormente las células se resuspenden en DMEM con 10% de SBF y se siembran en placas de cultivo.

4.16 Análisis de la síntesis de proteínas virales mediante marcaje metabólico

Para el marcaje de proteínas virales de nueva síntesis, se prepara una disolución con 60 µCi/ml de [³⁵S] Met-Cys (Amersham) en medio DMEM libre de metionina. Tras la incubación de la monocapa de células con el medio radiactivo durante 2 h, se retira completamente el

sobrenadante y se recogen las células en 100 µl de tampón de carga (160 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (v/v) SDS, 11% (v/v) glicerol, 0,1 M DTT, 0,033% (v/v) azul bromofenol). Las muestras se hierven durante 5 minutos y se analizan en geles desnaturizantes de poliacrilamida (15%) a 200 V. Los geles se fijan en 20% etanol 7,5% ácido acético (v/v), y se enjuagan con 3 lavados en agua destilada. Posteriormente se incuban en 1 M salicilato sódico durante 1 h y se secan durante 1 h a 80°C. Finalmente los geles se exponen usando una película de autorradiografía *Curix RP2* (Agfa) a -70°C.

4.17 Determinación de la frecuencia de mutación y la entropía normalizada de Shannon de los espectros de mutantes de las poblaciones virales analizadas

El efecto mutagénico de R en las poblaciones virales estudiadas se cuantifica con parámetros derivados de la comparación de secuencias. La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones distintas encontradas en un conjunto de secuencias dividido por el número total de nucleótidos secuenciados (Domingo, 2007). La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas (incluyendo las mutaciones repetidas) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados. Las frecuencias de mutación se calculan tal como fue descrito por Arias y cols. (Arias et al., 2001).

La entropía de Shannon normalizada es una medida de la similitud existente entre los genomas que constituyen un espectro de mutantes; toma valores entre 0 y 1, siendo 0 el valor que corresponde a la homogeneidad máxima (todas las moléculas analizadas son iguales entre sí) y 1 el valor de la máxima heterogeneidad (todas las moléculas estudiadas son distintas entre sí). La justificación teórica de este concepto se describe en (Volkenstein, 1994) y una aplicación al estudio de las cuasiespecies víricas puede encontrarse en (Airaksinen et al., 2003, Pariente et al., 2003, Pawlotsky et al., 1998, Ruiz-Jarabo et al., 2000, Sierra et al., 2007, Sierra et al., 2000). La entropía normalizada de Shannon (S_n) se calcula a partir de la ecuación:

$$S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$$

en la que p_i es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y N es el número total de secuencias analizadas.

4.18 Clonaje de la región genómica codificante de 3D de VFA en el vector de expresión pET-28a3Dpol

Se han construido los siguientes plásmidos que codifican mutantes de RNA polimerasas dependientes de RNA (3D) de VFA:

- pET28a-3D(P44S): codifica la 3D de VFA con la substitución P44S, denominada a lo largo de la Tesis Doctoral 3D(P44S).

- pET28a-3D(169S): codifica la 3D de VFA con la substitución P169S, denominada a lo largo de la Tesis Doctoral 3D(P169S).
- pET28a-3D(2M): codifica la 3D de VFA con la substitución P44S y M296I, denominada a lo largo de la Tesis Doctoral 3D(2M).
- pET28a-3D(3M): codifica la 3D de VFA con la substitución P44S, P169S y M296I, denominada a lo largo de la Tesis Doctoral 3D(3M).

Todas las variantes de 3D se han construido a partir del plásmido pET-28a3Dpol (ver apartado 4.10.1) o alguno de sus derivados (**Figura 4.2**). En el plásmido pET-28a3Dpol la secuencia de 3D queda fusionada a una secuencia propia del plásmido, de manera que tras la expresión de la proteína, el último aminoácido de 3D está unido a 11 aminoácidos suplementarios de los que 5 actúan de espaciador y 6 son una cola de polihistidina (secuencia AAALHHHHHH).

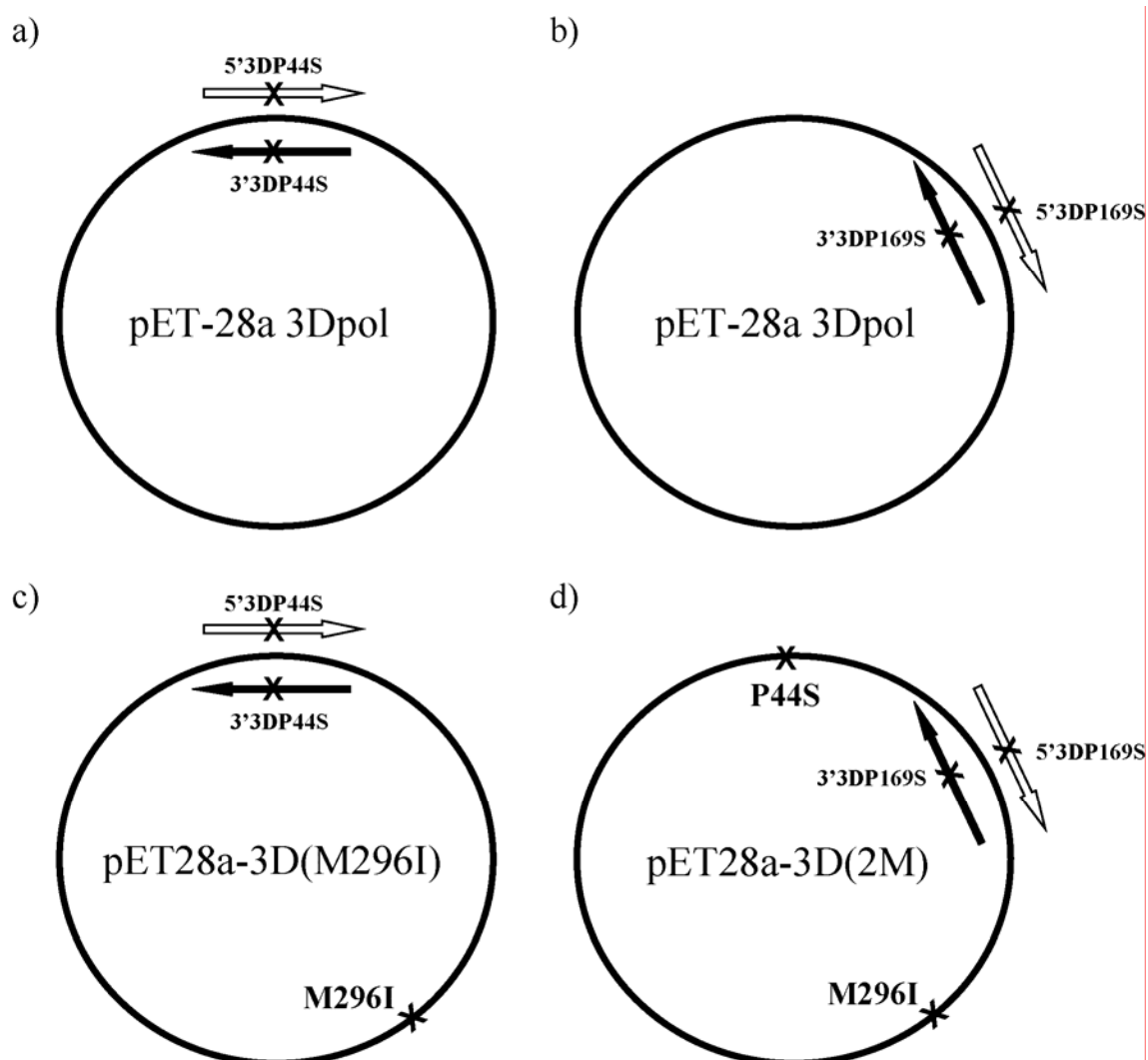


Figura 4.2 Representación esquemática de la obtención de los distintos vectores de expresión. Los círculos representan los plásmidos utilizados como molde de la reacción de PCR. El nombre de los distintos plásmidos aparece en el interior del círculo correspondiente. Los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR (**Tabla 4.1**) se representan como flechas blancas cuando la orientación es la misma que el RNA genómico de VFA, y como

flechas negras cuando la orientación es la misma que la de la cadena negativa de VFA. Las mutaciones originadas se representan por una cruz. Los cambios de aminoácido codificados por las distintas mutaciones introducidas se representan al lado de la cruz correspondiente. Para la construcción de los plásmidos pET28a-3D(P44) y pET28a-3D(P169S) [a) y b), respectivamente] se utiliza como molde de la PCR el plásmido pET-28a3Dpol. c) Para la obtención del vector de expresión pET28a-3D(2M) se utiliza como molde de la reacción de amplificación el plásmido pET28a-3D(M296I). Este plásmido ha sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Sierra et al., 2007) y ha sido construido por la Dra. Macarena Sierra. d) El plásmido pET28a-3D(3M) se obtiene utilizando como molde de la reacción de amplificación el plásmido pET28a-3D(2M) obtenido en c).

Para la obtención de las distintas polimerasas mutantes se emplea el kit *Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Este método se basa en la utilización de un plásmido circular como molde, en el que se introducen mutaciones en la polimerasa de VFA mediante amplificación por PCR usando los correspondientes oligonucleótidos mutagénicos que hibridan en la región codificante de 3D (**Tabla 4.1**). Los moldes de DNA y oligonucleótidos empleados en cada caso para la obtención de los distintos plásmidos de expresión se detallan en la **Figura 4.2**.

Se transforman células competentes *E. coli* DH5 α con 5 μ l del producto de PCR mutagénica [extraído mediante el kit *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega)]. Se aíslan las bacterias resultantes en placas Petri con medio LB que contiene kanamicina (70 μ g/ml, Sigma). Se comprueban las mutaciones introducidas mediante secuenciación del DNA plasmídico como se describe en el apartado 4.8. Los plásmidos que contienen las mutaciones deseadas se transforman en células competentes *E. coli* DH5- α . Se comprueba que durante el proceso de transformación no se ha alterado la secuencia del plásmido de interés mediante extracción del DNA plasmídico y posterior secuenciación como se ha indicado anteriormente.

4.19 Clonaje de la región genómica codificante de 2C de VFA en el vector de expresión pET-28a

Se han construido los siguientes plásmidos que codifican para mutantes de 2C de VFA:

- pET28a-2C: codifica la 2C de VFA con 19 aminoácidos suplementarios (secuencia descrita en 4.19.1) en el extremo N-terminal. Esta proteína se denomina a lo largo de la Tesis Doctoral 2C.
- pET28a-2C(I248T): codifica la 2C de VFA con la sustitución I248T y con 19 aminoácidos suplementarios en el extremo N-terminal. Esta proteína se denomina a lo largo de la Tesis Doctoral 2C(I248T).

4.19.1 Construcción del plásmido pET28a-2C

Para la construcción del pET28a-2C se amplifica la región codificante de la 2C de VFA (desde el nucleótido 4345 al 5298) por PCR a partir del plásmido pMT28. El fragmento amplificado se clona en el plásmido pET-28a (Novagen). Para la amplificación se utiliza el oligonucleótido 2CNdeI5' (**Tabla 4.1**) de polaridad positiva respecto al genoma de VFA, que

introduce mediante mutagénesis una diana de restricción para la enzima *NdeI* entre la posición genómica 4342 y 4347, y 2CEcoRI3' posición 5325, secuencia: CACAGATTTTTGGGAGGAATTCCTATCATTTGCTTAAAAATTGGGTGGCTTGACAC, de la misma polaridad que la cadena negativa de VFA, que introduce por mutagénesis una diana de restricción para la enzima *EcoRI* entre las posiciones 5305 y 5310 (región indicada con letra cursiva y subrayada en la secuencia del oligonucleótido). Además introduce dos codones de terminación de la traducción (en el extremo 3' inmediatamente después del nucleótido 5298, marcados en gris en la secuencia del oligonucleótido). La enzima utilizada durante la reacción de PCR es la *Pfu* DNA-polimerasa (Promega). Una vez obtenido el inserto, se purifica como se describe en el apartado 4.7, se digiere con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NdeI* (New England Biolabs) en un único paso, siguiendo los consejos del fabricante, se purifica de nuevo y se liga con el plásmido pET-28a (previamente digerido con las mismas enzimas de restricción) mediante T4 DNA ligasa (New England Biolabs), en el tampón suministrado por el fabricante. Para impedir la religación del vector, previamente se elimina el grupo 5' fosfato de los extremos del vector por tratamiento con fosfatasa alcalina (USB).

La introducción de la diana de restricción para *NdeI* en el extremo 5' de la región codificante de 2C provoca el cambio de aminoácido Leu→Met. Para reestablecer la secuencia que codifica Leu, se emplea el kit *Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) usando como molde el plásmido obtenido tras la ligación de la región codificante de 2C en pET-28a y los oligonucleótidos 2CpET5' (GTGCCGCGCGGCAGCCATCTCAAAGCACGTGACATCAACGAC) de la misma polaridad que el ADN plasmídico y 2CpET3' (GTTGATGTCACGTGCTTTGAGATGGCTGCCGCGCGGCACCAGGCC) de la misma polaridad que la cadena negativa del ADN plasmídico. En cada caso, la región del oligonucleótido que hibrida con la secuencia del plásmido se muestra en cursiva. La región que hibrida con la región codificante de 2C está escrita con letras normales. En negrita se indican los nucleótido que codifican el cambio al aminoácido original (L) en esa posición en la proteína 2C de VFA.

La reacción de mutagénesis y posterior transformación en bacterias *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21 se realiza como se describe en el apartado 4.18.

De este modo, la secuencia que codifica 2C queda fusionada a una secuencia propia del plásmido, de manera que tras la expresión de la proteína, en el extremo N-terminal de 2C hay 19 aminoácidos suplementarios (secuencia GSSHHHHHSSGLVPRGSH). En cursiva se muestra la cola de polihistidina (poli-His) y se subrayan los aminoácidos que son reconocidos específicamente por trombina y que permiten la eliminación de esta región suplementaria por tratamiento con esta proteasa.

4.19.2 Construcción del plásmido pET28a-2C(I248T)

La obtención del vector de expresión pET28a-2C(I248T) se realiza por mutagénesis dirigida utilizando el kit *Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit*. Como molde de la reacción se utiliza el plásmido pET28a-2C y como oligonucleótidos se utilizan mutCTu y

mutCTd (**Tabla 4.1**). La reacción de mutagénesis, transformación en bacterias competentes *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21, y posterior identificación por secuenciación de las mutaciones introducidas durante la reacción de amplificación, se realiza tal y como se describe en el apartado 4.18.

4.20 Expresión en *E. coli* de 2C y 3D recombinantes de VFA

El plásmido de expresión pET-28a contiene un gen de resistencia a kanamicina. Las colonias aisladas se crecen durante la noche en medio LB en presencia de kanamicina (70 µg/ml). Los cultivos se diluyen 20 veces y se crecen hasta alcanzar una densidad óptica (595 nm) de entre 0,8 y 1,2 en el caso de la 3D, y entre 0,6 y 0,8 en el caso de la 2C. En ese momento, en la fase exponencial, se añade IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido) (Fermentas) a una concentración final de 0,5 mM. Los cultivos se crecen entonces durante 2,5 horas más. Las células se centrifugan a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos en un rotor S3 (Sorvall), obteniéndose un sedimento de células que se congela a -20°C.

4.21 Purificación de la proteína 3D de VFA expresada en bacterias

La cola de histidinas en el extremo C-terminal de las 3D expresadas en *E. coli* (apartado 4.18) se utiliza para la purificación de 3D por cromatografía de afinidad por Níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA)-agarosa “ProBond Resin” (Invitrogen). El sedimento de bacterias (obtenidas tras aplicar el procedimiento descrito en 4.20) se resuspende en tampón fosfato 50 mM pH 7,8; que contiene 300 mM NaCl (tampón de resuspensión^{3D}) y se incuba durante 15 minutos a 4°C con agitación en presencia de 0,1 mg/ml lisozima (Sigma) y 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, Boehringer). Las células se sonicán alternando 4 ciclos de sonicación de 30 segundos con 4 ciclos de 30 segundos en hielo. La fracción soluble se recupera mediante dos centrifugaciones sucesivas de 15 minutos de duración a 10.000 r.p.m. en un rotor SS-34 (Sorvall). La muestra se pasa a través de la columna de Ni-NTA que ha sido previamente equilibrada en tampón de resuspensión^{3D} (apartado 4.30). La proteína unida se lava con 2 volúmenes de tampón de resuspensión^{3D}, con 1 volumen de tampón A^{3D} (50 mM tampón fosfato, pH 6,0, que contiene NaCl 500 mM) y 1 volumen de tampón A^{3D}, conteniendo 25 mM imidazol.

La proteína unida a la columna se eluye en un gradiente de imidazol (entre 50 y 500 mM) en tampón A^{3D}. Las fracciones se analizan mediante electroforesis discontinua en geles de poliácridamida en presencia de 0,1% SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Las fracciones que contienen la proteína pura según tinción por azul de coomassie [0,25% *Coomassie Brilliant Blue R250* (BioRad), 45% metanol, 10% ácido acético] y lavado en 10% etanol, 10% ácido acético, se juntan y se dializan a 4°C frente a un tampón de diálisis B^{3D} (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT y 1 mM EDTA). El proceso de diálisis se realiza con tres cambios de tampón, uno después de la noche y los otros dos a intervalos de 2-3 horas. Las enzimas se dializan en un tampón de diálisis B^{3D} que contiene 500 mM NaCl cuando se

utilizan exclusivamente para realizar ensayos de extensión de moldes heteropoliméricos (apartado 4.26, y 5.2.4.2 de Resultados).

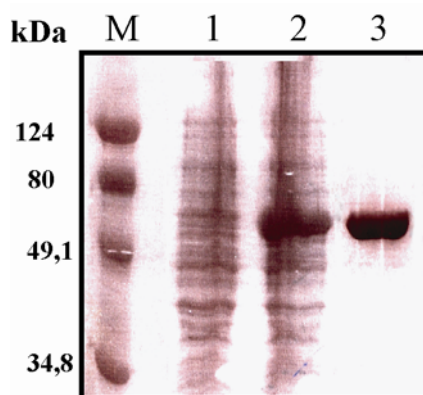


Figura 4.3. Análisis electroforético en SDS-PAGE de 3D recombinante expresada en *E.coli* y fusionada a una cola de poliHis en su extremo C-terminal. 1 y 2 muestran extractos celulares *E. coli* BL21 transformadas con un plásmido pET-28a-3Dpol sin inducir (1), o inducido (2) durante 2 horas mediante IPTG 1 mM. En el carril 3 se muestra la proteína 3D purificada mediante cromatografía de afinidad por Ni-NTA. M indica el marcador de masa molecular de proteínas en kDa. La masa molecular aparente de la proteína que aparece sobreexpresada en el patrón de bandas del extracto celular es de 55-60 kDa, concordante con la masa molecular esperada para 3D (56 kDa). Se muestra un preparado de 3D *wt*.

La proteína se distribuye en alícuotas y se congela a -20°C o -70°C . Todas las polimerasas recombinantes aisladas presentan una pureza superior al 95%, tal y como se muestra en el ejemplo de la **Figura 4.3**.

La concentración de proteína se determina mediante el valor medido de absorbancia y con el coeficiente de extinción molar de 3D de VFA que corresponde a 51.700 M^{-1} [servidor informático ExPASy (<http://www.expasy.org>)].

4.22 Purificación de la proteína 2C de VFA expresada en bacterias

La proteína 2C *wt* de VFA y el mutante de interés expresados en *E.coli* (apartado 4.19) se purifican mediante cromatografía de afinidad por Níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA)-agarosa (*ProBond Resin*, Invitrogen), gracias a la cola de polihistidinas que presentan en el extremo N-terminal. El protocolo de purificación se realiza tal y como se describe en (Banerjee et al., 1997).

El sedimento de bacterias se resuspende en tampón $\text{A}^{2\text{C}}$ [20 mM Tris HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM imidazol y 0,1% Triton X100 (Sigma)] (apartado 4.30) y se incuba durante 15 minutos a 4°C con agitación en presencia de 0,1 mg/ml lisozima (Sigma) y 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, Boehringer). Las células se sonicán alternando 5 intervalos de sonicación de 30 s con 5 intervalos de reposo en hielo durante 30 s. Tras centrifugación de 15 minutos de duración a 10.000 r.p.m. en un rotor SS-34 (Sorvall) a 4°C , se comprueba que 2C es

insoluble y permanece en cuerpos de inclusión. Para recuperar la proteína de los cuerpos de inclusión, el sedimento obtenido tras la centrifugación se disuelve en tampón A^{2C} con 6 M urea. La fracción soluble se recupera por centrifugación 15 minutos de duración a 10.000 r.p.m. en un rotor SS-34 (Sorvall) a 4°C. La muestra se pasa a través de la columna de Ni-NTA que había sido previamente equilibrada en tampón A^{2C} con 6 M urea. La proteína unida se lava con 4 volúmenes de tampón de resuspensión A^{2C} con 6 M urea y 10 mM imidazol, y posteriormente con 1 volumen de tampón A^{2C} que contiene 6 M urea, 50 mM imidazol, y 10% glicerol,

La proteína retenida se eluye de la columna de Ni-NTA con tampón A^{2C} que contiene 6M urea con 500 mM imidazol, 10% glicerol. Las fracciones se analizan mediante electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida, como se ha descrito en el apartado 4.21 y se juntan aquellas en las que la proteína es pura. La muestra se somete a 3 diálisis consecutivas frente al tampón de diálisis B^{2C} (50 mM Tris HCl, pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA y 20% glicerol) (apartado 4.30) que contiene 4 M urea, 2M urea y 0 M urea en cada caso. El proceso de diálisis en cada uno de los tampones se realiza a 4°C durante al menos 3 h. La proteína obtenida se distribuye en alícuotas y se congela a -70°C.

La concentración de proteína se determina mediante el valor medido de absorbancia y el coeficiente de extinción molar de 2C recombinante de VFA que corresponde a 34.920 M⁻¹, obtenido mediante el uso del servidor informático ExPASy (<http://www.expasy.org>).

4.23 Ensayos de actividad de la polimerasa de VFA

4.23.1 Ensayo de polimerización de poli(U)

Este ensayo de actividad se basa en la síntesis de poliuridilato mediante la incorporación de sucesivos residuos de uridina-5'-monofosfato (UMP) sobre un cebador de 15 nucleótidos de desoxitimidina [oligo(dT)₁₅]. Una molécula de poliadenilato [poli(A)] de 300 residuos de media de longitud (Amersham) actúa como molde de la reacción; el ensayo se realiza tal y como se ha descrito anteriormente (Arias et al., 2005).

Las reacciones se realizan en tampón 30 mM MOPS, pH 7,0, 33 mM NaCl, 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 40 ng/μl poli(A) (300 residuos de adenilato), 2,4 μM oligo(dT)₁₅ (Invitrogen). La concentración final de [α-³²P] UTP es 500 μM (0,01 mCi/ml, Amersham). La cantidad de enzima empleada varía entre 1 μM y 1,5 μM final. Cuando es necesario, las enzimas se diluyen justo antes de su uso en el tampón de diálisis utilizado en la purificación. La reacción se inicia al añadir 3D sobre de una mezcla precalentada a 37°C que contiene todos los reactivos indicados. La reacción se para a los 5 minutos añadiendo EDTA a una concentración final de 83 mM. El producto se aplica sobre una membrana DE-81 (Whatmann) y se deja secar. El UMP no incorporado se elimina mediante 4 lavados de la membrana con un exceso de 0,2 M Na₂HPO₄ (Merck). Se hace un lavado adicional en etanol absoluto y se seca 15 minutos a 55°C. Las membranas se exponen a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S). La radiactividad incorporada se mide por análisis en un Densitómetro BAS-1500 (Fujifilm) usando el programa Tina versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Staubenhardt, Alemania). Se calcula la

actividad relativa de polimerización de cada 3D mutante con respecto a la 3D *wt*. La actividad específica de 3D *wt* es 161 ± 8 pmol UMP incorporado/min por μg de enzima.

Para los ensayos realizados en presencia de concentraciones crecientes de FUTP o de UTP frío (apartado 5.6.10 de Resultados), el ensayo se lleva a cabo como se describe en el párrafo anterior, excepto que se utiliza $0,6 \text{ mM Mn}^{2+}$ como catión divalente en lugar de Mg^{2+} , y añadiendo distintas concentraciones ($0\text{--}200 \mu\text{M}$) del nucleótido problema a la mezcla de reacción.

4.23.2 Ensayo de polimerización de poli(G)

Este ensayo de actividad se basa en la síntesis de una cadena de poliguanidilato mediante la incorporación de sucesivos residuos de guanidina-5'-monofosfato (GMP) utilizando como molde de la reacción una molécula de policitidina [poli(C)] de 300 residuos de media de longitud (Amersham) que actúa como molde de la reacción.

Las reacciones se realizan en tampón 30 mM MOPS , $\text{pH } 7,0$, 10 mM NaCl , $15 \text{ mM Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $40 \text{ ng}/\mu\text{l}$ poli(C) (300 residuos de citidina de media). Se utiliza $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ GTP}$ (Amersham) a una concentración final de $500 \mu\text{M}$ ($0,01 \text{ mCi}/\text{ml}$). El ensayo se realiza tal y como se describe en el ensayo de síntesis de poli(U) (apartado 4.23.1). Se calcula la actividad relativa de polimerización de cada 3D mutante con respecto a la 3D *wt*. La actividad específica de 3D *wt* es 42 ± 8 pmol GMP incorporado/min por μg de enzima.

Cuando se realiza el ensayo de actividad empleando oligo(dG)₁₅ (oligonucleótido de 15 residuos de deoxiguanidilato) como cebador de la reacción de polimerización, éste se lleva a cabo de manera análoga al descrito, añadiendo a la mezcla de reacción $2,4 \mu\text{M}$ oligo(dG)₁₅ (Invitrogen).

4.23.3 Ensayo de uridilación del péptido VPg

Para el ensayo de uridilación de VPg se emplean péptidos sintéticos elaborados por el Servicio de Química de Proteínas y Síntesis de Péptidos del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM). Los péptidos utilizados tienen la secuencia de aminoácidos correspondiente a la VPg-1, VPg-2 y VPg-3 del VFA C-S8c1 (apartado 2.3.2.1 de Introducción), así como a distintos mutantes de VPg-1 (**Figura 4.4**). La mezcla de reacción contiene tampón 30 mM MOPS , $\text{pH } 7,0$, 33 mM NaCl , $0,6 \text{ mM MnCl}_2$, $40 \text{ ng}/\mu\text{l}$ poli(A), $150 \mu\text{M}$ VPg, $0,4 \text{ mg}/\text{ml}$ BSA (Boehringer), 8% glicerol y $50 \mu\text{M}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ UTP}$ ($0,01 \text{ mCi}/\text{ml}$; $200 \text{ mCi}/\text{mmol}$); $23 \mu\text{l}$ de una mezcla con todos los reactivos se preincuban durante 2 minutos a 37°C . La reacción se inicia añadiendo $2 \mu\text{l}$ de enzima ($0,4 \mu\text{M}$ concentración final) y se para a los 30 minutos por la adición de $5 \mu\text{l}$ de 500 mM EDTA (83 mM concentración final). Se calcula la actividad relativa de polimerización de cada 3D mutante con respecto a la 3D *wt*. La actividad específica de 3D *wt* es $0,43 \pm 0,02$ pmol UMP incorporado/min por μg de enzima.

Los ensayos realizados en presencia de Mg^{2+} se realizan en una mezcla de reacción que contiene 30 mM MOPS , $\text{pH } 7,0$, 33 mM NaCl , 5 mM MgCl_2 , 20 nM RNA cre (obtenido como se describe en el apartado 4.11), $150 \mu\text{M}$ VPg-1, $0,4 \text{ mg}/\text{ml}$ BSA (Boehringer), 8% glicerol,

0,16 mg/ml 3CD y 5-100 μ M [α - 32 P] UTP (0,01 mCi/ml; 200 mCi/mmol); 46 μ l de la mezcla se preincubaban durante 2 minutos a 37°C. La reacción se inicia añadiendo 4 μ l de enzima (0,4 μ M concentración final) y se para a distintos tiempos añadiendo EDTA (83 mM concentración final).

Vpg-1	GPYAGPLERQRLKVRACLPRQE
Vpg-1(Y3F)	..F.....
Vpg-1(P6A)A.....
Vpg-1(E8A)A.....
Vpg-1(R9A)A.....
Vpg-1(R9E)E.....
Vpg-2	GPYAGPMERQKPLKVKARAPVVKE
Vpg-3	GPYAGPVKKPVALKVKAKNLIVIE

Figura 4.4 Secuencia de aminoácidos los los péptidos sintéticos VPg utilizados en la Tesis Doctoral. Se representa la secuencia de aminoácidos con el código de una letra de las VPg desde el extremo N-terminal al C-terminal. En los mutantes de VPg-1 se indica la posición mutada con respecto al péptido parental.

Para los ensayos de inhibición de la uridilación del péptido VPg por distintos nucleótidos o análogos de nucleótido (apartado 5.6.2 y 5.6.11 de Resultados), se utilizan concentraciones crecientes (0-50 μ M) del nucleótido problema. Los nucleótidos trifosfato fueron suministrados por Invitrogen. Los análogos de nucleótido utilizados (FUTP, BrUTP e IUTP) son suministrados por Jena Bioscience.

Los productos de reacción se resuelven en geles de poliacrilamida (20%) en presencia de SDS (SDS-PAGE) con tampón Tris-tricina (Agudo et al., 2008, Ferrer-Orta et al., 2006). Los geles se exponen a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y la radiactividad incorporada se mide por análisis en un densitómetro BAS-1500 (Fujifilm).

4.23.3.1 Determinación de las constantes cinéticas $K_{m,app}$ para el ensayo de uridilación del péptido VPg y $K_{i,app}$ para la inhibición por FUTP

Los ensayos de uridilación del péptido VPg destinados a hallar la constante cinética $K_{m,app}$ del FUTP en presencia de RNA poli(A) y Mn^{2+} se llevan a cabo como se describe en el apartado anterior. Se obtienen datos de actividad de uridilación de VPg a distintos tiempos (5, 10, 15, 20, 30 minutos) para distintas concentraciones de UTP (2, 5, 10, 20 y 50 μ M). Para determinar la constante de inhibición por FUTP, $K_{i,app}$, se realizan ensayos cinéticos similares añadiendo en cada caso a la mezcla de reacción distintas concentraciones de FUTP (1, 5 y 10 μ M).

Para determinar la constante cinética $K_{m,app}$ de uridilación de VPg en presencia de Mg^{2+} , se obtienen datos de uridilación de VPg a 15, 30, 60 y 120 minutos utilizando varias concentraciones de UTP (5, 10, 20, 50 y 100 μ M). Para determinar la constante de inhibición

por FUTP, $K_{i,app}$, se realizan ensayos cinéticos similares añadiendo en cada caso a la mezcla de reacción distintas concentraciones de FUTP (10 y 25 μ M). Los productos de reacción se analizan tal y como se detalla en el apartado 4.23.3.

El RNA con la secuencia *cre* se obtiene tal y como se detalla en el apartado 4.11. La proteína recombinante 3CD con la secuencia de VFA C-S8c1 fue construida y expresada en nuestro laboratorio por el Dr. Armando Arias (Agudo et al., 2008).

4.24 Preparación de complejos heteropoliméricos molde-iniciador

Para el estudio de la incorporación de distintos nucleótidos por la polimerasa se han diseñado moléculas de RNA que aparean entre sí generando una estructura de doble cadena (sym/sub). En estos complejos ambas cadenas pueden actuar como molde e iniciador de la reacción (Arnold & Cameron, 2000). Se forma un dúplex de 6 pares de bases flanqueado por dos extremos protuberantes de cuatro nucleótidos idénticos en el extremo 5' (Dharmacon Research). Los complejos utilizados se denominan sym/sub AUGC, sym/sub ACGU y sym/sub CAUG, dependiendo de la secuencia de bases que sirven como molde de la reacción (**Figura 4.5**).

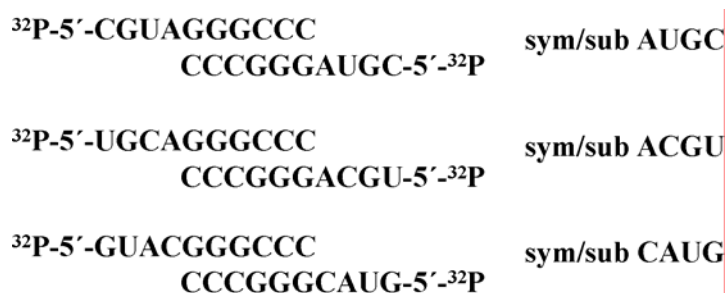


Figura 4.5 Secuencia de los complejos molde-iniciador empleados. Los sustratos sym/sub permiten el ensamblaje productivo de la 3D. Cada extremo protuberante de cuatro nucleótidos es competente para actuar de molde para la elongación, permitiendo la evaluación de uno o múltiples ciclos de incorporación si se seleccionan el nucleótido o nucleótidos apropiados como sustratos.

4.24.1 Marcaje en 5' de complejos molde-iniciador con ³²P

Los iniciadores se marcan en el extremo 5' con [γ^{32} P] ATP (5 μ Ci, 10 mCi/ml) (Amersham) y 10 unidades de polinucleótido quinasa de T4 (New England Biolabs). La reacción de marcaje se realiza en presencia de un tampón 70 mM Tris-HCl pH 7,6, que contiene 10 mM MgCl₂ y 5 mM DTT. Tras incubar durante 45 minutos a 37°C, se verifica la incorporación de fósforo radiactivo al oligonucleótido mediante cromatografía en placas de PEI-celulosa (TLC 20x20 cm.; Merck), utilizando como tampón de separación 0,5 M Na₂HPO₄. Posteriormente, se inactiva la enzima polinucleótido quinasa mediante incubación durante 10

minutos a 90°C. Los nucleótidos sin incorporar se eliminan tras pasar la muestra por columnas de Sephadex G-25 equilibradas con 10 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA (*Mini Quick Spin Oligo Columns*; Roche).

4.24.2 Hibridación de complejos molde-iniciador

Los complejos molde-iniciador marcados en 5' con ^{32}P se hibridan tras incubación a 90°C durante 1 minuto y posterior enfriamiento lento en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) hasta alcanzar 10°C. La concentración que se especifica en las leyendas de las figuras corresponde a la concentración final del híbrido en la mezcla de reacción.

4.25 Ensayos de retardo en gel

Los ensayos de retardo en gel permiten caracterizar *in vitro* la interacción de la 3D con RNA. Se utiliza como molde el oligonucleótido sym/sub AUGC (5'CGUAGGGCCC 3') (**Figura 4.5**) marcado en su extremo 5' con $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP, tal y como se describe en 4.24.1. El ensayo se lleva a cabo en un volumen de 10 μl en presencia de 100 mM MOPS, pH 7,0, 20 mM NaCl, 25 mM MnCl_2 , 5% (p/v) polietilenglicol 3000 (Merck), 20 nM $[\gamma^{32}\text{P}]$ sym/sub AUGC y concentraciones crecientes de 3D (0,25-2 μM). Tras 10 minutos de incubación a 37 °C los productos de reacción se resuelven en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 10% en el tampón TB (apartado 4.30) y se someten a electroforesis con un voltaje de 100 V, a 4°C, durante 1 hora en tampón TB. El gel se fija con etanol-ácido acético 10% (v/v) durante 5 minutos y se seca durante 45 minutos a 80°C. Los geles se exponen a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S). La radiactividad del RNA libre y de los complejos 3D-RNA se mide por análisis en un densitómetro BAS-1500 (Fujifilm).

4.26 Ensayos de extensión de moldes heteropoliméricos

Se han realizado diversos ensayos de extensión con moldes heteropoliméricos (**Figura 4.6**). Las reacciones (25 μl) se llevan a cabo en presencia de 30 mM MOPS, pH 7,0; 33 mM NaCl, 15 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 2 μM 3D y 0,5 μM $[\gamma^{32}\text{P}]$ -sym/sub. La mezcla de reacción se incuba durante distintos tiempos dependiendo de la enzima utilizada en el ensayo: cuando se utiliza **3D wt**, **3D(P169S)** ó **3D(M296I)** el tiempo de incubación es de 10 minutos, cuando se utiliza **3D(2M)** el tiempo de incubación es de 20 minutos. Finalmente, cuando se usa **3D(P44S)** ó **3D(3M)** el tiempo de incubación es de 30 minutos. Estos tiempos de incubación son aquellos a los cuales se ha formado una cantidad equivalente de complejo 3D-RNA para las distintas polimerasas utilizadas. Tras el tiempo de incubación para la formación del complejos 3D-RNA, se añade un exceso (5 μM) no marcado del mismo molde-iniciador como “trampa” de la reacción para evitar medir la incorporación de nucleótidos sobre complejos 3D-sym/sub formados *de novo*. Todas las reacciones se realizan a 37°C y se paran a diferentes tiempos, con

83 mM EDTA final. Los NTPs utilizados son de Amersham, a excepción de FUTP (Jena Bioscience) y RTP (Moraveck).

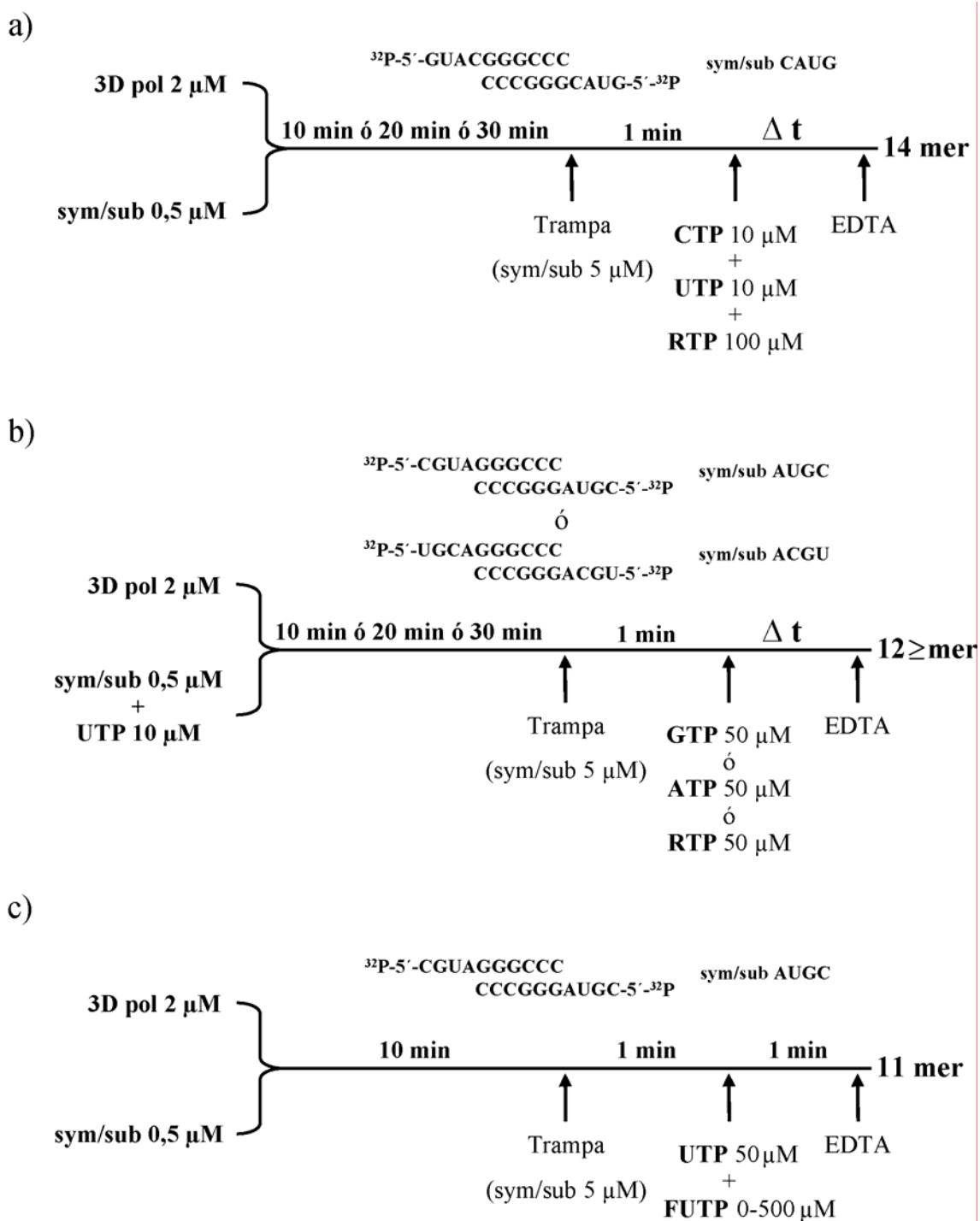


Figura 4.6 Esquema de los distintos ensayos bioquímicos de extensión de moldes heteropoliméricos. a) Cinética de incorporación de CTP, UTP y RTP utilizando un molde-iniciador sym/sub CAUG en presencia de MgCl_2 . Tras el tiempo de incubación apropiado dependiendo de la enzima utilizada en el ensayo, se añade un exceso de sym/sub que se utiliza como trampa. La reacción se inicia mediante la adición de CTP, UTP y RTP en las concentraciones indicadas. Δt indica que el ensayo se detuvo a diferentes tiempos (desde 1 hasta 30 minutos) utilizando EDTA como agente quelante. Se determina el porcentaje de iniciador elongado de 14 residuos. b) Ensayo de incorporación de

GTP, ATP ó RTP en la posición +2 del molde-iniciador en presencia de $MgCl_2$. Se utiliza **sym/sub AUGC** para medir la incorporación de ATP ó RTP enfrente de U y **sym/sub ACGU** para medir la incorporación de GTP ó RTP enfrente de C. Una mezcla que contiene 3D, sym/sub y UTP se incuba durante un tiempo determinado dependiendo de la enzima para que se forme el complejo 3D-RNA(n+1). Después se añade un exceso de molde-cebador. La reacción se inicia mediante la adición del nucleótido correspondiente. El UTP incorporado en la posición +1 permite la incorporación del nucleótido problema en la posición +2. La reacción se lleva a cabo durante diferentes tiempos (de 1 hasta 30 minutos). Se mide el porcentaje de iniciador elongado mayor o igual a 12 nucleótidos de tamaño. **c)** Ensayo para la determinación de la incorporación relativa de FUTP respecto a UTP utilizando un molde-iniciador **sym/sub AUGC**. La reacción se inicia mediante la adición de 50 μM UTP y 0-500 μM FUTP para medir la incorporación relativa de FUTP con respecto a UTP. Dado que el sym/sub en el que se incorpora UTP presenta movilidad electroforética diferente que en el que se incorpora FUTP, se calcula el porcentaje de iniciador elongado tanto por UTP como por FUTP.

Una vez completada la reacción, la mezcla se resuspende en tampón de aplicación a geles de poliacrilamida [formamida 90% (v/v), xilen-cianol 0,025% (p/v) y azul de bromofenol 0,025% (p/v)] y se incuba durante 5 minutos a 90°C. Los productos presentes se resuelven mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 23%, conteniendo urea 7 M en TBE (apartado 4.30). Los geles se exponen a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado y al iniciador no elongado se miden en un analizador de imagen Fujifilm BAS-1500 usando el programa Tina versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Staubenhardt, Alemania).

4.27 Detección de la incorporación de ribavirina-5'-trifosfato (RTP) en ensayos de síntesis de poli(G)

Se llevan a cabo usando como molde poli(C) (300 residuos de media de longitud; Amersham) y como cebador un oligonucleótico de 15 residuos de desoxiguanilato oligo(dG)₁₅ (Amersham). Las reacciones se realizan en 30 mM MOPS, pH 7,0; 33 mM NaCl, 15mM $Mg(CH_3COO)_2$, 40 ng/ μl poli(C), 2,4 μM oligo(dG)₁₅. 1 nM GTP [α -³²P] (20 mCi/mmol, 0,01 mCi/ml; Amersham), y concentraciones variables de RTP (100 ó 500 μM , Moraveck). 22,5 μl de la mezcla de todos los componentes se preincuban durante 2 minutos a 37°C, la reacción se inicia por adición de 2,5 μl de 3D (3 μM) y se para a los 30 minutos por la adición de 5 μl de 500 mM EDTA (83 mM concentración final).

Los productos de la reacción se someten al análisis de nucleótidos incorporados por la técnica de “vecino próximo” y análisis por cromatografía en capa fina (Volckaert & Fiers, 1977) (**Figura 4.7**). Los nucleótidos no incorporados se eliminan mediante columnas de Sephadex G25 (*Mini Quick Spin Oligo Columns*; Roche). El RNA se precipita en 1/10 volumen de 3M Na(CH₃COO), pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado se disuelve en agua y se digiere con una mezcla de RNAsa A (500 ng/ μl) (Boehringer Mannheim) y RNAsa T2 (0,1 U/ μl) (Sigma) durante 15 minutos a 37°C en 50 mM NH₄(CH₃COO)₂, pH 5,0. Los mononucleótidos resultantes se analizan mediante cromatografía en placas de PEI-celulosa, (TLC 20x20 cm., Merck), previamente tratadas con 2 M HCOOH pH 2,2 (Volckaert & Fiers, 1977). Para la resolución de los productos de la reacción, se usa como primer solvente 0,5%

HCOOH para los productos obtenidos con poli(C) como molde. Posteriormente se lleva a cabo una segunda resolución con 0,15 M formato de litio, ajustado a pH 3,0 con HCOOH. Los productos de la reacción son analizados y cuantificados mediante el analizador de imagen Fujifilm BAS-1500, como se ha descrito anteriormente.

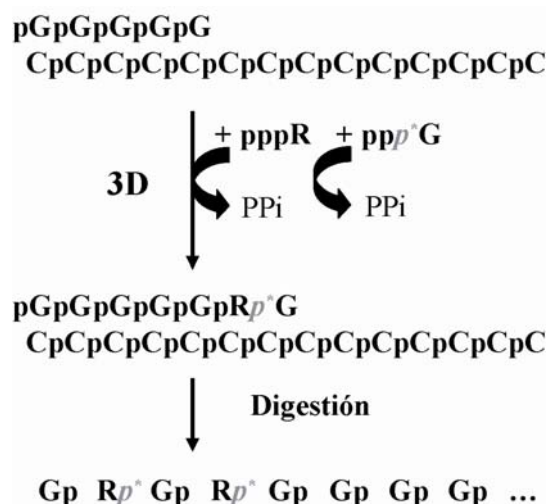


Figura 4.7 Análisis por transferencia de marca del vecino próximo. 3D utiliza ribavirina-5'-trifosfato (pppR) como sustrato y cataliza su incorporación en el extremo 3' del oligo (dG)₁₅, que aparea con poli(C), liberándose una molécula de pirofosfato (PPi). A continuación el GTP marcado en [α -³²P] (indicado con letra cursiva de color gris en ppp*G) libera PPi al incorporarse la guanosina-5'-monofostato posterior a R. Tras digestión enzimática se generan nucleósidos monofostato. En este caso, RMP se encuentra marcado por el fosfato del nucleótido vecino, GMP.

4.28 Ensayos de actividad de la 2C de VFA

Los ensayos de actividad de 2C de VFA se basan en medir su actividad ATPasa y GTPasa mediante cromatografía en capa fina de manera similar a como se ha descrito para la proteína 2C de otros picornavirus (Klein et al., 2000, Pfister & Wimmer, 1999, Rodríguez & Carrasco, 1993, Samuilova et al., 2006).

La reacción estándar se realiza en 50 mM MOPS (pH 7,5), 5 mM DTT, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ y 100 μ M [α -³²P] ATP ó GTP, dependiendo del ensayo. La concentración de enzima varía entre 1 μ M y 2 μ M final. Las enzimas se diluyen en el tampón de diálisis B^{2C} justo antes de su uso. El ensayo de actividad se inicia añadiendo la proteína 2C. La reacción se lleva a cabo a 37°C y se para a distintos tiempos añadiendo 100 mM EDTA concentración final. El producto de reacción se aplica sobre una placa de PEI-celulosa (TLC 20x20 cm; Merck) de 10 cm de altura, se deja secar y la cromatografía se revela con 0.85 M NaH₂PO₄. Cuando el frente de corrida alcanza el extremo superior, la placa se seca a 65°C. La radiactividad correspondiente al ADP ó GDP liberado en el ensayo se mide por análisis en un densitómetro BAS-1500 (Fujifilm).

Para determinar las constantes cinéticas K_{dapp} y k_{pol} para el ensayo de actividad ATPasa y GTPasa de 2C se realizan ensayos similares a los descritos en el párrafo anterior en los que se utilizan concentraciones crecientes desde 0,1 a 1000 μM [α - ^{32}P] ATP ó GTP (0,01 mCi/ml, Amersham). La reacción se para a distintos tiempos mediante la adición de 100 mM EDTA. De este modo se obtienen los distintos valores de k_{obs} para cada concentración de NTP, que se utilizan par determinar las constantes catalíticas tal y como se detalla en el correspondiente apartado de Resultados. La eficacia catalítica de 2C para cada uno de los ensayos realizados se define como ($k_{\text{pol}}/K_{\text{dapp}}$).

Los ensayos de actividad en los que se utiliza Mn^{2+} como catión divalente se realizan de manera análoga a los realizados con Mg^{2+} , utilizando 1 mM de MnCl_2 en lugar de 2 mM de MgCl_2 .

Los ensayos de actividad en presencia de poli(A) o poli(U) (300 residuos de media; Amersham) se realizan añadiendo a la mezcla de reacción 120 ng/ μl del polímero correspondiente.

Los ensayos en presencia de RTP (Moraveck), o GuH (Sigma), se realizan añadiendo la concentración adecuada de los distintos compuestos a la mezcla de reacción, según se detalla en el correspondiente apartado de Resultados.

El análisis y representación gráfica de los distintos datos obtenidos se realiza con el programa informático KaleidaGraph (Synergy Software).

4.29 Electrotransferencia de proteínas y detección con anticuerpos monoclonales o *Western blot*

Se aplican 2-5 μg de proteína (2C ó 3D) a un gel SDS-PAGE. Después de la electroforesis las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 196 mM glicina, 20% metanol y 0,1% SDS) a 250 mA durante 1,5 horas a 4°C. La membrana se bloquea con una solución que contiene 5% de leche en polvo en PBS-T (apartado 4.30) durante 1 h a 4°C. Posteriormente, se incuba en presencia del anticuerpo monoclonal adecuado diluido en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente, se lava en PBS-T 3 veces durante 5 minutos y a continuación se incuba en presencia de un anticuerpo secundario (Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, Bio-rad) diluido en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava nuevamente con PBS-T 4 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se revela con el kit *ECL Western Blotting Detection System* (Amersham), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se detecta la señal positiva por luminiscencia capturada en una película de autorradiografía *Curix RP2* (Agfa).

4.30 Disoluciones y tampones utilizados

- Solución de Tripsina-EDTA: 0,5 mg/ml Tripsina (Sigma), 0,016% etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA; Merck), 0,001% rojo fenol (Merck), diluidos en PBS.
- Solución de X-gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido 2% (X-gal, Roche) en dimetilformamida (Merck).
- Solución de IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido en agua destilada.
- PBS (solución salina tamponada con fosfato): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,8.
- PBS-T: PBS y 0,2% Tween 20.
- Tampón de resuspensión^{3D}: 50 mM Tampón fosfato pH 7,8, 300 mM NaCl.
- Tampón A^{3D}: 50mM Tampón fosfato pH 6,0, 500 mM NaCl.
- Tampón de diálisis B^{3D}: 50mM Tris HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT y 1 mM EDTA.
- Tampón A^{2C}: 20 mM Tris HCl pH, 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM imidazol y 0,1% Tritón X100.
- Tampón de diálisis B^{2C}: 50 mM Tris HCl; pH 7,4, 100 mM KCl, 20% glicerol, 1 mM DTT y 1 mM EDTA.
- TAE: 40 mM Tris acetato, pH 8,3, 1 mM EDTA.
- TB: 85 mM Tris HCl, 85 mM borato.
- TBE: 90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA.
- TE: 10 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA.
- Tampón Tris-Tricina: 200 mM Tricina, 200 mM Tris, 0,5% SDS.

5. Resultados

5 Resultados

5.1 Caracterización biológica de variantes del virus de la fiebre aftosa adaptadas a replicar en presencia de ribavirina

5.1.1 Pases seriados de poblaciones del virus de la fiebre aftosa en presencia de concentraciones crecientes de ribavirina

En nuestro laboratorio se ha descrito que la ribavirina (R) ejerce actividad antiviral para el virus de la fiebre aftosa (VFA). El tratamiento con la droga de células BHK-21 persistentemente infectadas con VFA permitió la extinción del virus, manteniendo la viabilidad celular (de la Torre et al., 1987). Se ha demostrado que parte de la actividad antiviral de R en estas infecciones se debe a una acción mutagénica de la droga sobre el virus (Airaksinen et al., 2003), lo que está de acuerdo con resultados obtenidos con poliovirus (Crotty et al., 2000).

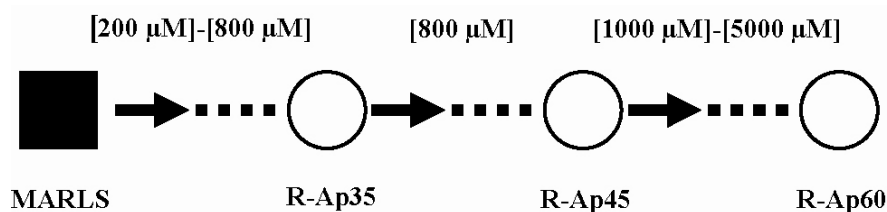


Figura 5.1 Esquema de los pases seriados de VFA MARLS en presencia de R. El clon biológico VFA MARLS se representa como un cuadrado negro. Las poblaciones virales se representan como círculos blancos. Las flechas negras representan pases en presencia de R. La concentración de R utilizada durante los pases se expresa entre corchetes encima de las flechas negras. La población R-Ap35 fue obtenida a partir de la población VFA MARLS por la Dra. Macarena Sierra en nuestro laboratorio (Sierra et al., 2007). Se incluye en el esquema para mostrar el origen de las poblaciones estudiadas durante la presente Tesis Doctoral.

Recientemente, la Dra. Macarena Sierra ha caracterizado en nuestro laboratorio un mutante de VFA MARLS (descrito en el apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos) que tiene menor sensibilidad a R y que se obtuvo tras 35 pases citolíticos de VFA en concentraciones crecientes de R (0-800 µM). La mutación asociada a menor sensibilidad a R se localiza en la región codificante de la polimerasa viral (3D) (G7497A) y codifica la substitución M296I (Sierra et al., 2007). Se planteó como primer objetivo de esta Tesis Doctoral estudiar la base molecular de la adaptación de esta población a un incremento mayor en la concentración de R.

Para ello, se realizan infecciones sucesivas de la población R-Ap35 (descrita en el apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos) en presencia de concentraciones crecientes de R, tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado 4.4.2) (**Figura 5.1**). Los 10 primeros pases se realizan en presencia de 800 µM R, obteniéndose la población R-Ap45. Posteriormente, la concentración de R aumenta desde 1000 µM hasta 5000 µM, desde el pase 46 hasta el pase 54 y

los últimos 6 pases se realizan en presencia de 5000 μM R, obteniéndose la población R-Ap60 (apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos).

5.1.2 Efecto de la ribavirina en la producción viral y síntesis de RNA de poblaciones de MARLS tratadas con R

Se ha determinado como afecta R a la producción viral (PFU) y el número de moléculas de RNA viral de las poblaciones tratadas con R (**Tabla 5.1**). Como control se calculan estos mismos parámetros de la población no tratada Ap35 (apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos).

Tabla 5.1 Título viral, producción de RNA e infectividad específica de las poblaciones MARLS estudiadas.

POBLACIÓN	CANTIDAD DE RNA ^a	TÍTULO VIRAL ^b	INFECTIVIDAD ESPECÍFICA ^c
Ap35	$3,4 \pm 0,4 \times 10^{11}$	$6,5 \pm 0,9 \times 10^7$	19×10^{-5}
R-Ap35	$0,8 \pm 0,1 \times 10^{11}$	$1,4 \pm 0,3 \times 10^7$	18×10^{-5}
R-Ap45	$2,0 \pm 0,5 \times 10^{11}$	$1,2 \pm 0,3 \times 10^7$	6×10^{-5}
R-Ap60	$1,0 \pm 0,0 \times 10^{11}$	$0,2 \pm 0,0 \times 10^7$	2×10^{-5}

^a Número de moléculas de RNA viral por ml de sobrenadante de cultivo.

^b Título viral medido como pfu/ml de sobrenadante de cultivo.

^c Infectividad específica medida como PFU/moléculas de RNA viral.

La determinación del título y de la cantidad de RNA viral se realiza según se describe en los apartados 4.4.3 y 4.9, respectivamente, de Materiales y Métodos.

Los datos muestran una reducción progresiva de la infectividad específica de las poblaciones según incrementa la concentración de R y el número de pase. La infectividad específica de R-Ap60 es 10 veces inferior a la de la población inicial de la que deriva, R-Ap35, y de la población no tratada Ap35.

5.1.3 Análisis molecular de las poblaciones MARLS tratadas con R

Anteriormente, en nuestro laboratorio hemos descrito que la población viral R-Ap35 presenta un cambio de nucleótido (G7497A) que codifica para la sustitución M296I en 3D y que confiere menor sensibilidad a R (Sierra et al., 2007).

Para comprobar si mayores incrementos de R durante los pases en cultivos originan nuevas mutaciones en la polimerasa de VFA, se ha secuenciado la región 3D de las poblaciones R-Ap45 y R-Ap60 (ver apartados 4.5.1, 4.6 y 4.8 de Materiales y Métodos).

El análisis muestra que 2 nuevas mutaciones no sinónimas se imponen en la secuencia consenso (**Tabla 5.2**). En la población R-Ap45 se impone la mutación C6739U (P44S), que ya está presente en mezcla en la población previa R-Ap35. Además, la sustitución M296I impuesta

en R-Ap35 se mantiene. En la población R-Ap60 aparece una tercera mutación (C7114U) que origina el cambio P169S. Por tanto, tras el tratamiento progresivo con R se obtiene una población con 3 sustituciones en la polimerasa: P44S, P169S y M296I.

Tabla 5.2 Mutaciones encontradas en la secuencia consenso de 3D de las poblaciones MARLS tratadas con R.

CAMBIO DE NUCLEÓTIDO ^a			CAMBIO DE AMINOÁCIDO ^c
R-Ap35 ^b	R-Ap45 ^b	R-Ap60 ^b	
C6739C/U	C6739U	C6739U	<u>P44S</u>
		A6741G	=
		C6744U	=
		C6975U	=
A7003A/U			I132V
G7098G/A	G7098A	G7098A	=
		C7114U	<u>P169S</u>
C7350C/U			=
	C7374A	C7374A	=
C7404C/U	C7404U	C7404U	=
		C7413U	=
		U7419C	=
G7453G/A			E282K
G7497A	G7497A	G7497A	<u>M296I</u>
C7506C/A	C7506A	C7506A	=
C7548C/U	C7548U	C7548U	=
		G7554U	=
		U7569C	=
C7935C/U	C7935U	C7935U	=
	C7947U	C7947U	=

^a Cambios de nucleótido observados en cada una de las poblaciones estudiadas con respecto a la población parental MARLS. 2 nucleótidos separados por una barra indica mezcla de los 2 nucleótidos en la población, según el cromatograma obtenido en la secuenciación. La numeración de los nucleótidos del genoma del VFA C-S8c1 es según (Escarmís et al., 1999).

^b Las poblaciones virales estudiadas se describen en el apartado 5.1.1 y 4.2.1 de Materiales y Métodos.

^c Cambios de aminoácido en 3D encontrados en las poblaciones estudiadas. En negrita y subrayado aparecen las sustituciones de aminoácido provocadas por las mutaciones completamente impuestas. El símbolo “=” indica que la mutación correspondiente es una mutación sinónima y que por lo tanto no produce un cambio de aminoácido. Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal.

5.1.4 Análisis del espectro de mutantes de las poblaciones MARLS tratadas con R

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que las frecuencias de mutación de poblaciones de VFA pasadas en células BHK-21 en ausencia de mutágenos están comprendidas en el rango de 0,7 a $6,0 \times 10^{-4}$ sustituciones por nucleótido (s/nt) (Airaksinen et al., 2003, Pariente et al., 2003, Sierra et al., 2000). En estos espectros de mutantes se observa una modesta dominancia de las mutaciones C→A, C→U y U→C. El tratamiento con R es mutagénico para diversos virus RNA, entre ellos VFA (Airaksinen et al., 2003, Sierra et al., 2007). En nuestro laboratorio, hemos observado que la frecuencia de mutación en presencia de R de poblaciones de VFA tratadas con R oscila en torno a 2×10^{-3} s/nt, y las mutaciones mayoritarias son C→U y G→A [30 de un total de 37 mutaciones identificadas (Sierra et al., 2007)].

Tabla 5.3 Heterogeneidad del espectro de mutantes de poblaciones de VFA MARLS pasadas en presencia y ausencia de R.

Población ^a	Nucleótidos Secuenciados ^b	Nº de Clones Analizados	Mutaciones (Distintas/Totales) ^c	Frecuencia de Mutación Mínima ^d	Frecuencia de Mutación Máxima ^e	Entropía de Shannon ^f
Ap35	18270	21	5/5	3×10^{-4}	3×10^{-4}	0,2
R-Ap35	18620	14	78/135	42×10^{-4}	72×10^{-4}	1
R-Ap45	15960	12	37/46	23×10^{-4}	29×10^{-4}	1
R-Ap60	19950	15	64/79	32×10^{-4}	40×10^{-4}	1

^a Las poblaciones analizadas se describen en el apartado 5.1.1 y 4.2.1 de Materiales y Métodos. El análisis de la población Ap35 fue realizado por la Dra. Macarena Sierra; se muestra aquí como comparación.

^b Número de nucleótidos secuenciados. Se analiza la región genómica comprendida entre las posiciones 6667 y 7997.

^c Número de mutaciones distintas y totales encontradas en el espectro de mutantes de cada población analizada.

^d La frecuencia de mutación mínima se calcula dividiendo el número de mutaciones distintas por el número total de nucleótidos secuenciados en cada población (apartado 4.17 de Materiales y Métodos).

^e La frecuencia de mutación máxima se calcula dividiendo el número total de mutaciones encontradas dividido por el total de nucleótidos secuenciados en cada población (apartado 4.17 de Materiales y Métodos).

^f La entropía normalizada de Shannon se calcula como $S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, donde p_i es la frecuencia de cada secuencia en la cuasispecie y N es el número de genomas comparados (apartado 4.17 de Materiales y Métodos).

Para investigar si el incremento en la concentración de R produce un aumento en la frecuencia de mutación de las poblaciones derivadas de R-Ap35, se ha analizado la región 3D de clones moleculares de las poblaciones R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60 según se describe en el apartado 4.10.1 de Materiales y Métodos. Los valores de frecuencia de mutación de las poblaciones tratadas con R son unas 10 veces superiores al valor de la población Ap35, pasada en ausencia de R. También se observa que las frecuencias de mutación de R-Ap45 y R-Ap60

disminuyen respecto a la población R-Ap35 (**Tabla 5.3**). Este dato sugiere que la aparición de nuevas mutaciones en la polimerasa viral (P44S y P169S), puede contribuir a este descenso en la frecuencia de mutación.

Las transiciones C→U y G→A son los cambios mayoritarios asociados al tratamiento con R. Se encuentra un 84%, 47% y 75% de este patrón de transiciones para las poblaciones R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60, respectivamente (**Tabla 5.4**). Estos resultados están de acuerdo con los tipos de mutaciones encontradas en experimentos anteriores durante el tratamiento de VFA con R (Airaksinen et al., 2003, Sierra et al., 2007).

Tabla 5.4 Tipos de mutación encontradas en las poblaciones de VFA MARLS pasadas en presencia y ausencia de R.

TIPO DE MUTACIÓN ^b		FRECUENCIA ^a			
		Ap35 ^c	R-Ap35 ^c	R-Ap45 ^c	R-Ap60 ^c
Transiciones	C→U	0,40	0,51	0,28	0,47
	G→A	-	0,33	0,19	0,28
	U→C	0,20	0,01	0,23	0,17
	A→G	0,40	0,06	0,06	0,05
Transversiones	C→A	-	0,07	0,06	0,02
	G→U	-	0,01	0,02	-
	C→G	-	0,01	-	-
	A→C	-	-	0,13	-
	U→G	-	-	0,02	0,01

^a Frecuencia con la que aparecen los distintos tipos de cambio de nucleótido con respecto al número total de mutaciones halladas en el espectro de mutantes de cada una de las poblaciones virales estudiadas. “-” indica que no existe ese tipo de mutación dentro del espectro de mutantes analizado. El análisis de la población Ap35 fue realizado por la Dra. Macarena Sierra; se muestra aquí como comparación.

^b Tipos de mutaciones (transiciones y transversiones) encontradas en el espectro de mutantes de las distintas poblaciones de VFA estudiadas.

^c Las poblaciones analizadas se describen en el apartado 5.1.1 y 4.2.1 de Materiales y Métodos. Los nucleótidos secuenciados y el número de clones analizados se describen en la Tabla 5.3.

Este análisis muestra que además de un aumento en la complejidad del espectro de mutantes, existe una dominancia de las transiciones C→U y G→A [abreviado (C→U)+(G→A)] frente a las transiciones de tipo U→C y A→G [abreviado (U→C)+(A→G)] en poblaciones tratadas (R-Ap35, $\chi^2 = 69,4$ P < 0,001; R-Ap45, $\chi^2 = 7,5$ P < 0,001 y R-Ap60, $\chi^2 = 14,1$ P < 0,001). En la población R-Ap45 existe un gran número de las transversiones A→C con respecto a las poblaciones R-Ap35 y R-Ap60; sin embargo, la proporción de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) no varía significativamente entre los espectros de mutantes

de poblaciones tratadas con R (R-Ap35 comparado con R-Ap45, $\chi^2 = 3,82$ $P > 0,1$; R-Ap45 comparado con R-Ap60, $\chi^2 = 0,07$ $P > 0,9$ y R-Ap35 comparado con R-Ap60 $\chi^2 = 3,00$ $P > 0,1$).

5.1.5 Cambios de aminoácido encontrados en las secuencias consenso de las poblaciones tratadas con R

El análisis de cambios de aminoácido encontrados en los espectros de mutantes de las poblaciones (**Tabla 5.5**) muestra que en R-Ap35 hay una gran diversidad de mutaciones no sinónimas que no están impuestas en la secuencia consenso de la región 3D. Sin embargo, en las poblaciones R-Ap45 y R-Ap60, esta heterogeneidad disminuye, sugiriendo que la aparición de P44S y p169S, respectivamente, ha contraído la diversidad genética de la población.

Tabla 5.5 Cambios de aminoácido producidos por las mutaciones encontradas en los espectros de mutantes de las poblaciones de VFA MARLS pasadas en presencia de R.

CAMBIO DE AMINOÁCIDO ^b	FRECUENCIA ^a		
	R-Ap35 ^c	R-Ap45 ^c	R-Ap60 ^c
P44S	0,71	1	1
I132V	0,50	0	0,13
P169S	0	0	1
E282K	0,43	0,25	0
M296I	1	1	1

^a Frecuencia de las distintas substituciones de aminoácido halladas en el espectro de mutantes de cada una de las poblaciones virales estudiadas.

^b Solamente se representan los cambios de aminoácido en 3D encontrados en 2 o más clones. Los aminoácidos se representan según el código de una letra (explicado en Abreviaturas) y se numeran desde el aminoácido N-terminal al C-terminal.

^c Las poblaciones analizadas se describen en el apartado 5.1.1 y 4.2.1 de Materiales y Métodos.

5.1.6 Las poblaciones R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60 muestran una ventaja selectiva en presencia de R, pero no en su ausencia

Con el fin de analizar si las mutaciones adquiridas por VFA MARLS durante el tratamiento con R afectan a su eficacia biológica, se han realizado experimentos de competición con el virus Ap9 (VFA MARLS pase 9, apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos) en mezcla con cada una de las poblaciones de VFA estudiadas (R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60) en presencia y ausencia de R. Los resultados obtenidos se representan en la **Figura 5.2**.

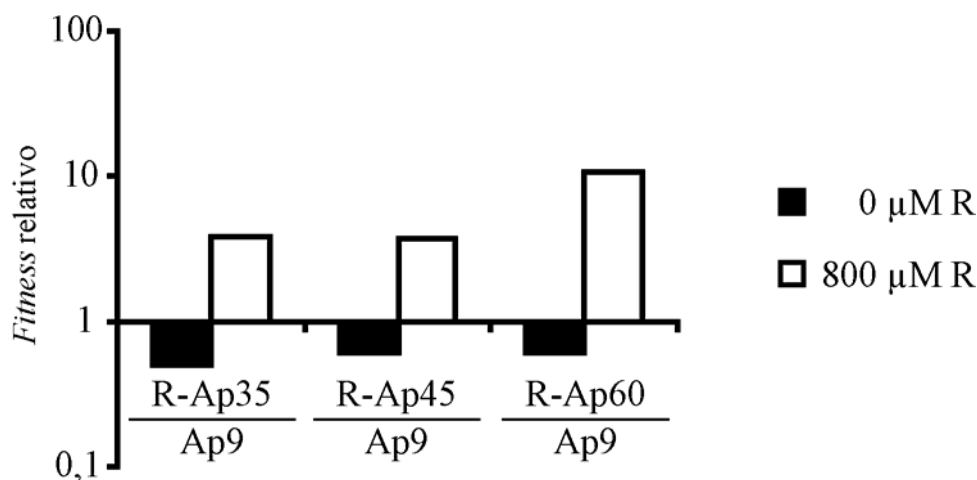


Figura 5.2 Valores relativos de *fitness* de las poblaciones de VFA MARLS pasadas en presencia de R. Las poblaciones de la competición se muestran como una fracción en el eje de abscisas. En cada caso, se muestra el valor de *fitness* en ausencia y presencia de R de la población del numerador con respecto a la del denominador. Las infecciones en ausencia y presencia de R y el cálculo de *fitness* relativo se realizan como se describe en los apartados 4.4.1, 4.4.2 y 4.13.1, respectivamente, de Materiales y Métodos. La concentración de R indicada que es la que se utiliza durante todos los pases de la competición.

Los resultados muestran que el *fitness* relativo de R-Ap35 con respecto a Ap9 es 4 en presencia de 800 μM R, pero 0,5 en ausencia de R. La población viral R-Ap45 muestra unos valores similares (4 y 0,6 en presencia y ausencia de R, respectivamente), mientras que la población R-Ap60 muestra un incremento de *fitness* en presencia de 800 μM R, pero no en ausencia de R (11 y 0,6 en presencia y ausencia de R, respectivamente).

Estos valores confirman que las poblaciones de VFA MARLS tratadas con R presentan una ventaja selectiva en presencia de la droga pero desventaja en su ausencia. El mismo ensayo de competición realizado en presencia de 5000 μM R muestra un valor de *fitness* de 15 para R-Ap60. Este resultado, junto con el valor de *fitness* de esta población en presencia de 800 μM R, demuestra que la población R-Ap60 ha adquirido una mayor adaptación a R que los virus R-Ap35 y R-Ap45, probablemente debido a que ha replicado a altas concentraciones de droga (Figura 5.1).

Para determinar si la adaptación observada en R-Ap60 es específica de R y no de cualquier agente mutagénico, se realiza el mismo ensayo en presencia de FU e hidrocloreuro de guanidinio (GuH) (FU, 200 $\mu\text{g/ml}$; GuH). En este caso el valor relativo de *fitness* es de 0,7, por lo que la adaptación del virus R-Ap60 a R es específica.

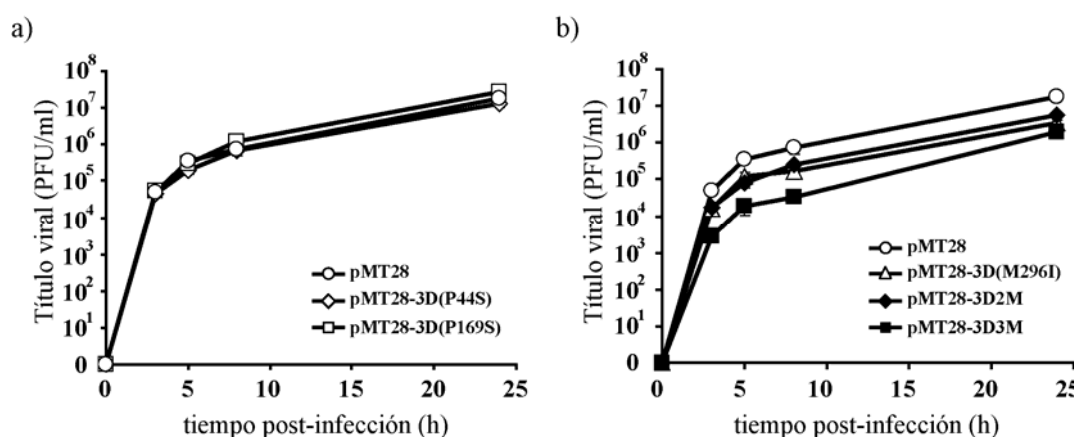


Figura 5.3 Cinética de producción de virus que expresan polimerasas mutantes. **a)** Cinética de producción viral tras infección de células BHK-21 (m.d.i. de 0,5 PFU/célula) con los virus indicados en la leyenda incluida en la gráfica. Se recogen alícuotas de 600 μ l del medio de cultivo a distintos tiempos post-infección, que inmediatamente se reponen con 600 μ l de DMEM fresco. Se titula por triplicado mediante plaqueo según se explica en el apartado 4.4.3 de Materiales y Métodos. El origen de los virus empleados, así como los procedimientos de infecciones en medio líquido y determinación del título viral se describen en los apartados 4.2.2 y 4.4 de Materiales y Métodos. Se muestran las desviaciones estándar. **b)** Igual que en a) realizando la infección en células BHK-21 con los virus indicados en la leyenda incluida en la gráfica.

5.1.7 viabilidad de los clones infecciosos de VFA con mutaciones de adaptación a R

La adaptación de las poblaciones de VFA MARLS a R puede estar asociada a las distintas mutaciones que aparecen a lo largo de los pases en la polimerasa 3D. Sin embargo, este efecto también podría deberse a otras modificaciones genéticas en el genoma viral.

Para estudiar el efecto en la adaptación a R de las mutaciones surgidas en la región codificante de la polimerasa (P44S, P169S y M296I), se han construido los clones infecciosos pMT28-3D(P44S), pMT28-3D(P169S), pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M) cuyo origen se describe en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos. Los transcritos infecciosos de estos plásmidos se transfectaron en células BHK-21 para obtener VFA con polimerasas mutantes con 1 única sustitución: pMT28-3D(P44S), pMT28-3D(P169S) y pMT28-3D(M296I), con 2 sustituciones: pMT28-3D(2M) (contiene P44S y M296I) o con 3 sustituciones: pMT28-3D(3M) (contiene P44S, P169S y M296I) en el contexto genético de VFA C-S8c1. Por tanto, estos virus quiméricos no contienen ninguna mutación de adaptación a R, excepto las encontradas en la región 3D. En ausencia de R, los virus pMT28-3D(P44S) y pMT28-3D(P169S) alcanzan títulos prácticamente iguales al pMT28 *wt* [Figura 5.3(a)], lo cual sugiere que estas mutaciones por separado no alteran significativamente la capacidad replicativa del VFA en cultivos celulares. Los virus pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(2M) y sobre todo pMT28-3D(3M) muestran una reducción en el título viral y un retraso en la cinética de producción viral [Figura 5.3(b)].

5.1.8 Los clones infecciosos con polimerasas mutantes presentan una disminución en la cinética de producción de RNA viral

Para determinar si las mutaciones en 3D encontradas en virus adaptados a R causan un retraso en la replicación viral, se ha determinado la producción de RNA intracelular a tiempos cortos post-infección de los clones infecciosos mutantes. Se realizan infecciones en BHK-21 con los virus derivados de pMT28-3D(P44S), pMT28-3D(P169S), pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M) y se recoge el RNA intracelular a distintos tiempos postinfección. El RNA viral se cuantifica mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Se observa que los virus mutantes presentan una modesta reducción en la capacidad de síntesis de RNA a tiempos cortos post-infección con respecto a pMT28 (**Figura 5.4**).

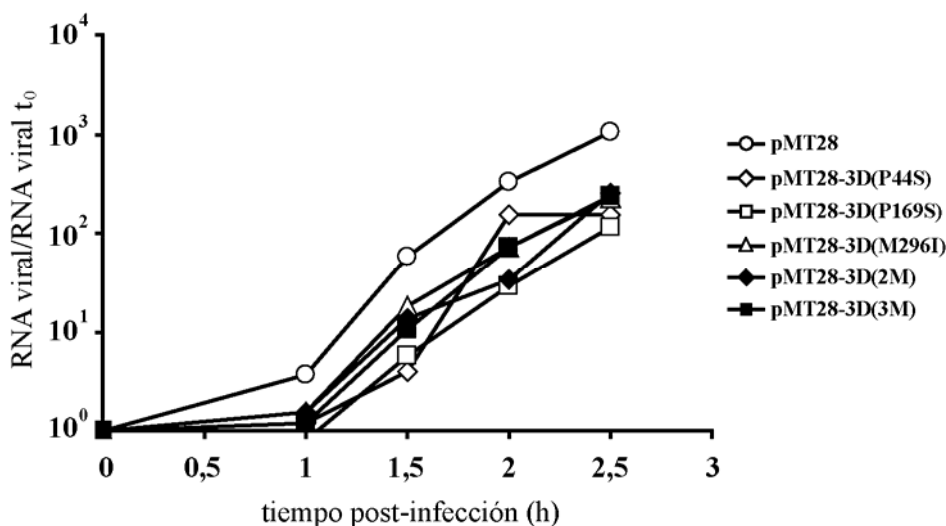


Figura 5.4 Cinética de la síntesis de RNA intracelular en virus con polimerasas mutantes. Se infectan células BHK-21 a una m.d.i. de 0,5 PFU/célula con los virus indicados en la leyenda incluida en la gráfica. Cada uno de los puntos representados proviene de una infección independiente. El origen de los virus empleados, así como los procedimientos de infecciones en medio líquido, extracción del RNA viral intracelular y cuantificación del mismo se describen en los apartados 4.2.2, 4.4.1, 4.5.2 y 4.9, respectivamente, de Materiales y Métodos.

5.1.9 Los clones infecciosos con polimerasas mutantes presentan generalmente incrementos en la eficacia biológica en presencia de R, pero no en su ausencia

Con el fin de analizar el efecto de las distintas mutaciones encontradas en 3D durante el tratamiento con R (P44S, P169S y M296I), se ha determinado el *fitness* en ensayos de competición con pMT28 *wt* tanto en ausencia como en presencia de R [**Figuras 5.5(a) y (b)**].

Todos los virus mutantes presentan una ventaja respecto a pMT28 en presencia de R. Los virus pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M) tienen una eficacia relativa de 4, 3 y 4, respectivamente, en relación al virus pMT28, indicando que las polimerasas

codificadas por estas poblaciones representan una ventaja selectiva en presencia de R. Los virus pMT28-3D(P44S) y pMT28-3D(P169S) muestran eficacias biológicas de 1,3 de 2, respectivamente en presencia de R 800 μ M, [Figura 5.5(a) y (b)].

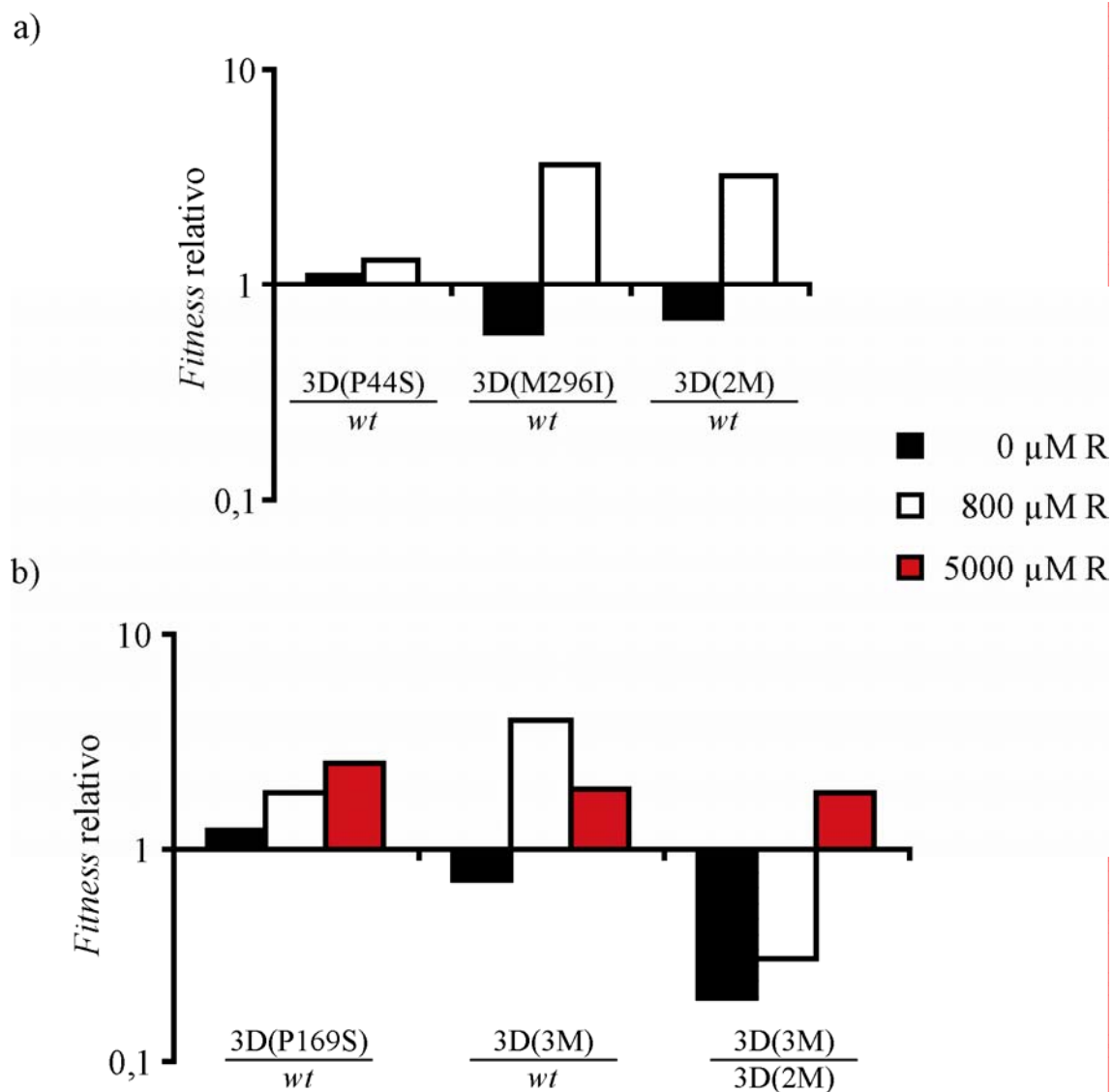


Figura 5.5 Valores relativos de *fitness* de los clones infecciosos con mutaciones en 3D. Los pMT28 utilizados en la competición se muestran como una fracción en el eje de abscisas. En cada caso, se muestra el valor de *fitness* en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de R de la población del numerador con respecto a la del denominador. Las infecciones en ausencia y presencia de R y el cálculo de *fitness* relativo se realizan como se describen en los apartados 4.4.1, 4.4.2 y 4.13.2 respectivamente, de Materiales y Métodos. El valor de concentración de R que se muestra es el que se utiliza durante todos los pases de la competición.

A altas concentraciones de R (5000 μ M), el valor de *fitness* de pMT28-3D(3M) es 2, e indica, de nuevo, una ventaja del mutante a altas concentraciones de R. Este valor es más bajo que el obtenido para la competición en presencia de R 800 μ M (4,0). Además, ambos valores

son mucho menores a los obtenidos por la población viral R-Ap60 de la que proceden las mutaciones en 3D respecto a la población control Ap9.

El virus con la mutación P169S presenta un valor de *fitness* de 3 a 5000 μ M R, indicando que esta mutación confiere por sí sola, una gran ventaja como respuesta a altas concentraciones de R.

En ausencia de R, las poblaciones de virus pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M) presentan una eficacia biológica relativa menor que pMT28 (0,6; 0,7 y 0,7, respectivamente). Sin embargo los virus pMT28-3D(P44S) y pMT28-3D(P169S) no muestran ninguna desventaja con respecto al virus pMT28 (1,1 y 1,2 respectivamente). Estos datos están de acuerdo con las cinéticas de producción viral representadas en la **Figura 5.3**.

Se ha realizado un ensayo de competición entre los virus pMT28-3D(3M) y pMT28-3D(2M) para determinar la aportación en la eficacia biológica de la mutación P169S en el contexto de una polimerasa con las sustituciones P44S y M296I. Se observa que el *fitness* relativo de la población derivada de pMT28-3D(3M) con respecto a pMT28-3D(2M) en ausencia y en presencia de 800 μ M R es 0,2 y 0,3; indicando que el cambio P169S implica una desventaja en ausencia o presencia de baja concentración de R. Sin embargo, en presencia de 5000 μ M R se observa que pMT28-3D(3M) tiene un *fitness* de 2, indicando que la mutación P169S se selecciona a altas concentraciones de R.

5.1.10 Concentraciones elevadas de R causan extinción viral de pMT28, pero no del mutante pMT28-3D(3M)

La mutagénesis letal es una estrategia antiviral basada en el aumento de la tasa de error para producir la extinción viral (apartado 2.2 de Introducción). Resultaba del máximo interés determinar si R era capaz de extinguir VFA en pases citolíticos y comprobar el efecto de la droga en el mutante pMT28-3D(3M), que presenta las mutaciones de adaptación a R en 3D.

Para ello se realizan 10 infecciones seriadas de los virus pMT28 y pMT28-3D(3M) (pMT28 con P44S, P169S y M296I en 3D) tanto en presencia como en ausencia de 5000 μ M R (**Figura 5.6**).

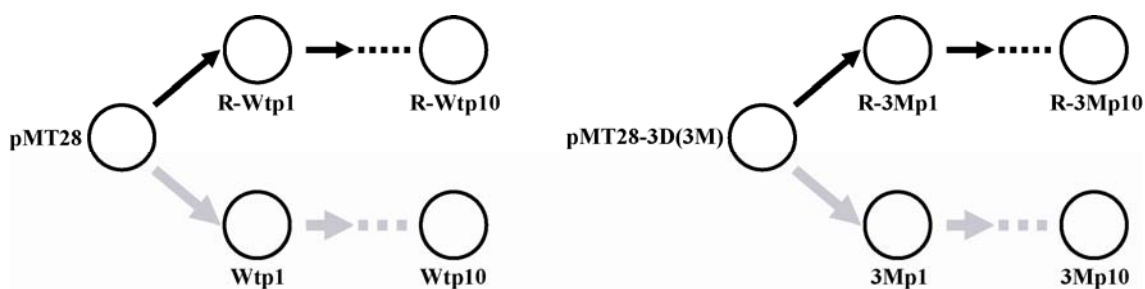


Figura 5.6 Esquema de los pases seriados de los virus pMT28 *wt* y pMT28-3D(3M) en presencia y ausencia de 5000 μ M R. Los virus pMT28 y pMT28-3D(3M), así como las poblaciones virales resultantes tras los pases se representan como círculos blancos. Las flechas negras representan pases en presencia de 5000 μ M R, las flechas

grises gruesas representan pases en ausencia de R. Las poblaciones denominadas Wt y R-Wt derivan del virus pMT28 pasado en presencia o ausencia, respectivamente, de 5000 μ M R. Las poblaciones denominadas 3M y R-3M derivan del virus pMT28-3D(3M) pasado en presencia o ausencia, respectivamente, de 5000 μ M R. La letra “p” seguida de un número indica el número de pase de la población correspondiente. El origen de los virus utilizados así como los procedimientos para la realización de infecciones de VFA en medio líquido se encuentran en los apartados 4.2.2 y 4.4 de Materiales y Métodos.

En presencia de R, las poblaciones derivadas de pMT28 (R-Wt) muestran una disminución progresiva en la producción viral a lo largo de los pases hasta hacerse indetectable (< 5 PFU/ml en el pase 7) [Figura 5.7(a), círculos negros]. En cambio, las poblaciones derivadas de pMT28-3D(3M) tratada con R (R-3M) presentan una disminución menos brusca en el título viral (~ 100 PFU/ml en el pase 7). A partir de ese pase, la producción viral aumenta hasta alcanzar 2×10^4 PFU/ml en la población del pase 10 (R-3Mp10) [Figura 5.7(b), triángulos negros].

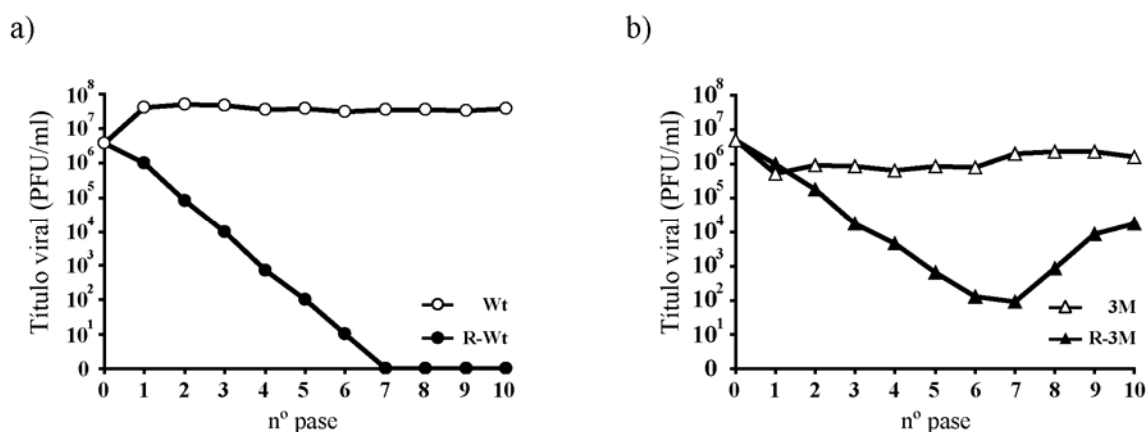


Figura 5.7 Infectividad de las poblaciones virales Wt y 3M derivadas de clones infecciosos en presencia o ausencia de 5000 μ M R. a) Infectividad medida por PFUs/ml a lo largo de 10 pases de pMT28 y pMT28-3D(3M) en células BHK-21, según se describe en la Figura 5.6. Los sobrenadantes de las distintas infecciones se recogen a las 24 h postadsorción. Los símbolos blancos muestran la infectividad de las poblaciones pasadas en ausencia de R (Wt). Los símbolos negros muestran la infectividad de las poblaciones pasadas en presencia de 5000 μ M R (R-Wt). b) Igual que en a) partiendo de una infección originada por pMT28-3D(3M) que da lugar a las poblaciones 3M en ausencia de R, y a las poblaciones R-3M en presencia de R. El origen de los virus utilizados, así como los procedimientos para la realización de infecciones de VFA en medio líquido y en medio semisólido, se encuentran en los apartados 4.2.2 y 4.4 de Materiales y Métodos.

Para demostrar que la ausencia de PFU en R-Wtp7 se debe a la extinción del virus, se realizan 3 pases sucesivos en cultivos celulares a partir del sobrenadante de R-Wtp7 tal y como se detalla en (Sierra et al., 2000). Tras estos 3 pases no se recupera infectividad medida por PFU ni material genético amplificable por RT-PCR correspondiente a la región 3D. Recientemente en nuestro laboratorio se ha confirmado la existencia de variantes de VFA no citolíticos capaces de replicar de manera persistente en células BHK-21 (Escarmís et al., 2008). Para descartar que

el virus R-Wtp7 mantiene capacidad replicativa en forma de una infección persistente, se realizan 3 pases sucesivos de las células infectadas por R-Wtp7. De nuevo se comprueba que no hay progenie viral ni amplificación por RT-PCR. Por lo tanto, la población R-Wt se extingue tras tratamiento con 5000 μ M R, mientras que la población mutante R-3M es resistente a la extinción.

En ausencia de R, el título viral de ambas poblaciones (Wt y 3M) se mantiene constante a lo largo de los pases [Figura 5.7(a) y (b), símbolos blancos], siendo el título viral de las poblaciones Wt 2 órdenes de magnitud mayor que el de las poblaciones 3M a lo largo de toda la serie de pases.

5.1.11 Infectividad específica de las poblaciones Wt y 3M tras pases en presencia o ausencia de R

Se ha descrito previamente que en las extinciones virales mediadas por mutagénesis letal se produce una disminución en la infectividad específica. Este valor representa la producción de partículas infecciosas (PFU) respecto al número total de genomas en la población (Gonzalez-Lopez et al., 2004, Grande-Perez et al., 2005a, Grande-Perez et al., 2005b). Para comprobar si en la extinción viral de la población R-Wt ha habido una pérdida de infectividad específica, se ha medido la cantidad total de RNA viral a lo largo de los pases tanto en ausencia como en presencia R (Figura 5.8).

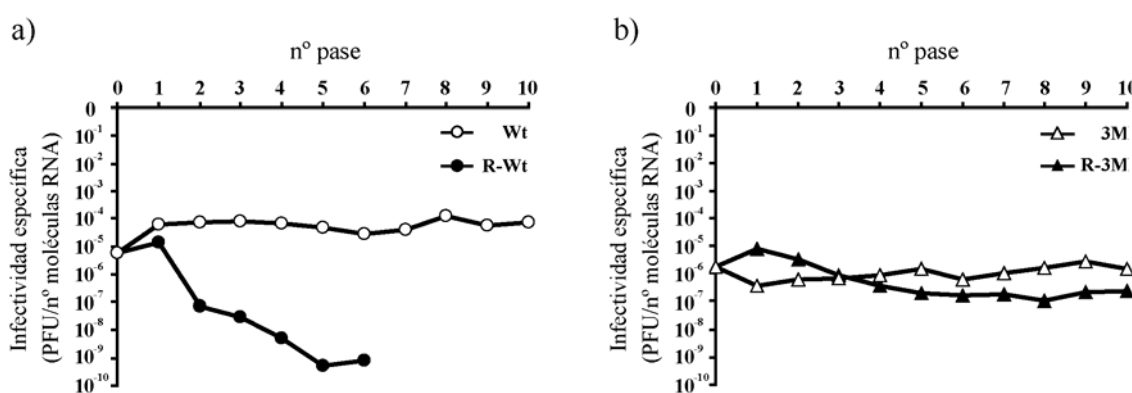


Figura 5.8 Infectividad específica de las poblaciones virales derivadas de pMT28 y pMT28-3D(3M) en presencia o ausencia de 5000 μ M R. a) Infectividad específica medida por PFUs/nº moléculas de RNA de las poblaciones virales Wt y 3M que se muestran en la Figura 5.7. La extracción y cuantificación del RNA viral total de cada una de las poblaciones se detallan en los apartados 4.5.1 y 4.9, respectivamente, de Materiales y Métodos. Los símbolos blancos muestran la infectividad específica de las poblaciones pasadas en ausencia de R (Wt). Los símbolos negros muestran la infectividad específica de las poblaciones pasadas en presencia de 5000 μ M R (R-Wt). b) Igual que en a) partiendo de una infección originada por pMT28-3D(3M) dando lugar a las poblaciones 3M en ausencia de R, y R-3M en presencia de R.

El valor de infectividad específica a lo largo de los pases de las poblaciones R-Wt disminuye hasta 5 órdenes de magnitud [Figura 5.8(a), círculos negros]. Sin embargo, en R-

3M, se observa que la infectividad específica se mantiene constante a lo largo de los pases y en el mismo nivel que las poblaciones 3M pasada en ausencia de R [Figura 5.7(b), triángulos negros].

En ausencia de R, tanto las poblaciones Wt como las poblaciones 3M, presentan constante la infectividad específica a lo largo de los pases [Figura 5.8(a) y (b), símbolos blancos]. Por tanto, R provoca la extinción viral de VFA en cultivos celulares tras una pérdida de infectividad específica que no se observa en las poblaciones derivadas de pMT28-3D(3M).

Se ha secuenciado la región de 3D comprendida entre los nucleótidos 6984 y 7783 de la población R-Wtp6 (población preextinción) y se observa que mantiene invariable la secuencia consenso con respecto a la misma zona de la región 3D de pMT28.

5.1.12 Análisis del espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28 y pMT28-3D(3M)

Para comprobar si la extinción en R-Wt se ha producido mediante mutagénesis letal, se realiza un estudio de la frecuencia de mutación de las cuasiespecies virales de distintas poblaciones derivadas de pMT28 y pMT28-3D(3M) pasadas en presencia y ausencia de R.

Se han analizado los espectros de mutantes de las poblaciones no tratadas (Wtp0, Wtp5, 3Mp0 y 3Mp5) y de las poblaciones tratadas con R (R-Wtp2, R-Wtp4, R-Wtp6, R-3Mp2, R-3Mp4, R-3Mp6 y R-3Mp10)

Tabla 5.6 Frecuencia de mutación máxima de los espectros de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28 y pMT28-3D(3M) pasadas en presencia de 5000 μ M R.

PASE	R-Wt		R-3M	
	FRECUENCIA DE MUTACIÓN ^a	MUTACIONES POR GENOMA ^b	FRECUENCIA DE MUTACIÓN ^a	MUTACIONES POR GENOMA ^b
p0	4×10^{-4}	3	2×10^{-4}	2
p2	16×10^{-4}	13	9×10^{-4}	7
p4	19×10^{-4}	16	13×10^{-4}	11
p6	20×10^{-4}	17	13×10^{-4}	11
p10	-	-	14×10^{-4}	12

El espectro de mutantes de las poblaciones R-Wtp6 y R-3Mp6 se basa en el análisis de la secuencia de la región de 3D de dichas poblaciones, comprendida entre los nucleótidos 6984 y 7783, tal y como se describe en el apartado 4.10.3 de Materiales y Métodos. El espectro de mutantes del resto de poblaciones estudiadas se realiza como se detalla en el apartado 4.10.2 de Materiales y Métodos. Se han secuenciado 12320 nucleótidos en la población pMT28, 13104 en la población pMT28-3D(3M), 31770 nucleótidos en la población Wtp5, 23780 en la población 3Mp5, 23432 en la población R-Wtp2, 32664 en la población R-Wtp4, 15548 en la población R-Wtp6, 27748 nucleótidos en la población R-3Mp2, 26332 en la población R-3Mp4, 22126 en la población R-3Mp6 y 24533 nucleótidos en la población R-3Mp10. La zona secuenciada es entre los nucleótidos 6620 y 8020.

^a La frecuencia de mutación máxima está expresada como número total de mutaciones encontradas con respecto al número total de nucleótidos secuenciados (apartado 4.17 de Materiales y Métodos).

^b El número de mutaciones por genoma se calcula a partir de la frecuencia de mutación estimando que el genoma de VFA tiene 8300 nucleótidos.

La extracción de RNA viral total así como el método de clonaje del cDNA de cada una de las poblaciones se detallan en los apartados 4.5.1 y 4.10, respectivamente, de Materiales y Métodos. La frecuencia de mutación de R-Wtp10 no se ha determinado debido a que la última población con material genómico amplificable es R-Wtp6.

Al comparar los resultados (**Tabla 5.6**) se observa que las poblaciones R-3M mantienen a lo largo de los pases una frecuencia de mutación siempre inferior a la que muestran los espectros de mutantes de la población R-Wt. La frecuencia de mutación en las poblaciones R-3M nunca excede 14×10^{-4} s/nt, mientras que todas las poblaciones R-Wt muestran valores por encima de 14×10^{-4} s/nt, con 20×10^{-4} s/nt en la población preextinción R-Wtp6. A pesar de ello, las diferencias entre R-Wt y R-3M no son lo suficientemente grandes como para ser significativas (frecuencia de mutación de R-Wtp4 1,4 veces mayor que la de R-3Mp4; t de Student = 1,49 $P > 0,05$).

De igual manera, la frecuencia de mutación de la población no tratada Wtp5 es 1,5 veces mayor que la de la población no tratada 3Mp5 (6×10^{-4} y 4×10^{-4} s/nt), aunque de nuevo, esta diferencia no es significativa ($t = 0,43$ $P > 0,05$).

La complejidad de los espectros de mutantes de las poblaciones estudiadas también se determinó midiendo su entropía de Shannon normalizada (S_n) (apartado 4.17 de Materiales y Métodos). Aunque no existen diferencias significativas entre Wtp5 y 3Mp5, existe un ligero incremento entre los valores de S_n de R-Wtp4 y R-3Mp4 ($S_n = 0,41$ para Wtp5 y $S_n = 0,42$ para 3Mp5; $S_n = 0,96$ para R-Wtp4 y $S_n = 0,86$ para R-3Mp4), sugiriendo que la complejidad en presencia de R es menor en la población mutante.

5.1.12.1 Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28 y pMT28-3D(3M)

Como se ha explicado anteriormente (apartados 5.1.4 y 2.8.2.2.5 de Introducción) el tratamiento de VFA con R favorece un aumento en la proporción de las transiciones (C→U)+(G→A) tanto en infecciones persistentes como citolíticas (Airaksinen et al., 2003, Sierra et al., 2007). Para comprobar el efecto de R en el tipo de mutaciones encontradas en los pases derivados de pMT28 y pMT28-3D(3M) se analiza el número de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en los espectros de mutantes de dichas poblaciones (apartado 5.1.10). En todos los casos se verifica que la secuencia consenso de la región 3D analizada de estas poblaciones no se había alterado.

En la población Wtp5, el porcentaje de transiciones de tipo (U→C)+(A→G) es 78% con respecto al total de mutaciones encontradas, [22% (C→U)+(G→A)] (**Tabla 5.7**). Sin embargo, en poblaciones derivadas de pMT28 estudiadas tratadas con R (R-Wt) es siempre menor al 33% del total de mutaciones. Es decir, el patrón de transiciones en Wtp5 con respecto a R-Wtp4, es significativamente diferente ($\chi^2 = 13,8$ $P < 0,001$).

En el caso de la población derivada de pMT28-3D(3M) tratada con R, R-3Mp4, la frecuencia de las transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes no

es significativamente diferente de la población no tratada 3Mp5, ni tampoco de la población no tratada Wtp5 ($\chi^2 = 0,49$ $P > 0,1$ y $\chi^2 = 0,15$ $P > 0,1$ respectivamente; **Tabla 5.7**). En conjunto, durante la extinción de la población R-Wt por R, se produce un aumento en la proporción de transiciones (C→U)+(G→A) con respecto al espectro de mutantes de poblaciones no tratadas con R (Wt). Sin embargo, las poblaciones mutantes R-3M, que son resistentes a la extinción, no sufren este desbalance en el patrón de transiciones en sus espectros de mutantes a lo largo de los distintos pases con respecto a las poblaciones no tratadas con R (3M).

Tabla 5.7 Frecuencia de las transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en los espectros de mutantes estudiados en el apartado 5.1.12.

POBLACIÓN	TRANSICIONES			
	(C→U)+(G→A)		(U→C)+(A→G)	
	% ^a	Frecuencia ^b	% ^a	Frecuencia ^b
Sin R				
Wtp5	22	$1,3 \times 10^{-4}$	78	$4,7 \times 10^{-4}$
3Mp5	27	$0,9 \times 10^{-4}$	55	$2,2 \times 10^{-4}$
Con R				
R-Wtp2	68	11×10^{-4}	32	$5,1 \times 10^{-4}$
R-Wtp4	80	15×10^{-4}	20	$3,8 \times 10^{-4}$
R-Wtp6	78	16×10^{-4}	15	$3,0 \times 10^{-4}$
R-3Mp2	38	$3,4 \times 10^{-4}$	62	$5,6 \times 10^{-4}$
R-3Mp4	34	$4,4 \times 10^{-4}$	63	$8,2 \times 10^{-4}$
R-3Mp6	32	$4,2 \times 10^{-4}$	68	$8,8 \times 10^{-4}$

^a Porcentaje de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en los espectros de mutantes de las poblaciones no tratadas Wtp5 y 3Mp5, y tratadas con R R-Wtp2, R-Wtp4, R-Wtp6, R-3Mp2 R-3Mp4 y R-3Mp6 representadas en la figura 5.7. El porcentaje de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) está expresado con respecto al total de mutaciones (transiciones y transversiones) encontradas en los correspondientes espectros de mutantes.

^b Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) calculado a partir del producto del porcentaje de transiciones por la frecuencia de mutación de cada una de las poblaciones indicadas (**Tabla 5.6**, y apartado 5.1.12). Los valores están basados en el análisis de los espectros de mutantes estudiados en el apartado 5.1.12.

5.2 Caracterización bioquímica de polimerasas mutantes de VFA seleccionadas durante tratamiento con R

Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio han demostrado que el principal mecanismo de acción antiviral de R frente a VFA se debe tanto a su acción mutagénica directa como indirecta por disminución de la concentración intracelular de GTP y desbalance en los niveles relativos de los nucleótidos intracelulares (Airaksinen et al., 2003). Recientemente hemos demostrado en ensayos *in vitro* que la polimerasa 3D de VFA es capaz de incorporar la ribavirina-5'-trifosfato (RTP) frente a C y U en el molde en RNA (Sierra et al., 2007). Además, se ha comprobado que una polimerasa 3D con la substitución M296I, surgida como consecuencia de un tratamiento del virus en presencia de R, incorpora menos eficientemente RTP frente a C y U en el molde que una polimerasa 3D sin esta sustitución durante la síntesis de RNA (Arias et al., 2008, Sierra et al., 2007).

En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que las mutaciones que surgen en la región 3D de VFA como consecuencia del incremento en la concentración de R en el medio de cultivo, otorgan una ventaja en presencia de R, tanto en el contexto genético de VFA MARLS como de C-S8c1 (clon infeccioso pMT28) (apartado 5.1.6 y 5.1.9). Era de máximo interés investigar el comportamiento de RTP como sustrato de las polimerasas 3D *wt* y 3D mutantes codificadas por los virus tratados con R. Para ello, se clonaron los genes codificantes de las enzimas 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M) en el plásmido pET-28a, se expresaron en *E.coli* BL21 y se purificaron a partir de los extractos mediante cromatografía de afinidad en Ni-NTA, tal y como se detalla, respectivamente, en los apartados 4.18, 4.20 y 4.21 de Materiales y Métodos. Las enzimas obtenidas se caracterizaron empleando distintos ensayos bioquímicos descritos en los apartados 4.23, 4.25, 4.26 y 4.27 de Materiales y Métodos.

5.2.1 La polimerasa 3D de VFA muestra síntesis *de novo*

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se ha puesto a punto un ensayo de síntesis de poli(G) con 3D utilizando RNA poli(C) como molde y un oligonucleótido de 15 residuos de deoxiguanidilato [oligo(dG)₁₅] como iniciador de la síntesis. Este ensayo nos permite medir la capacidad de polimerización de 3D y complementa los ensayos realizados hasta la fecha en nuestro laboratorio con un molde de poli(A) [síntesis de poli(U)] (Arias et al., 2005). Durante el desarrollo de estos experimentos se ha comprobado que 3D tiene capacidad de sintetizar poli(G) *de novo* en ausencia de iniciador (**Figura 5.9**) a diferencia de lo que ocurre en la síntesis de poli(U) (apartado 4.23.1 de Materiales y Métodos). La incorporación de GTP en ausencia de cebador es similar a la actividad en su presencia (128±26% comparado con 100±5%). Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral, se han realizado los ensayos de síntesis de poli(G) en ausencia de iniciador. Anteriormente, ha sido descrita la síntesis de poli(G) *de novo* por 3D de PV en condiciones similares a este ensayo, aunque en ese caso, la actividad en ausencia de iniciador fue hasta 10 veces inferior que en su presencia (Arnold et al., 1999).

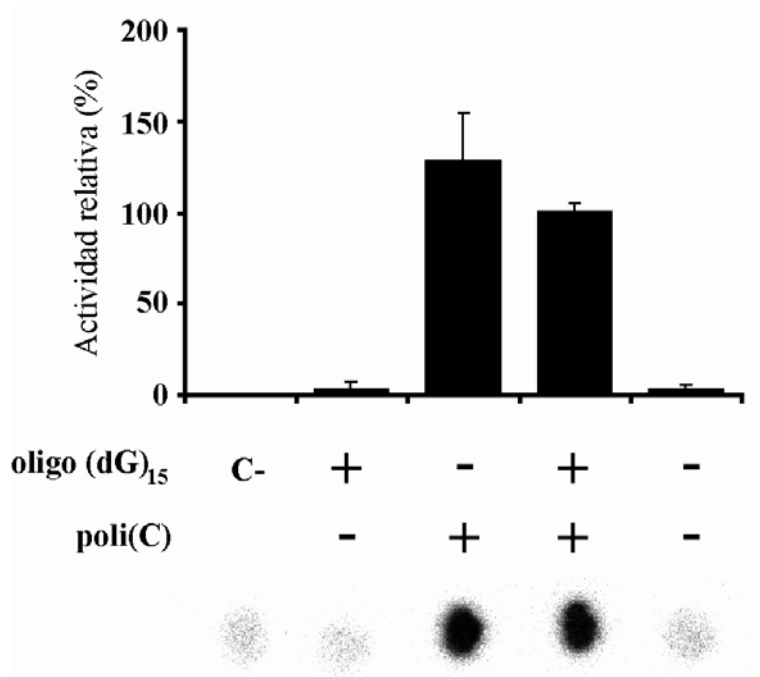


Figura 5.9. Caracterización del ensayo de síntesis de poli(G) por 3D purificada. Actividad relativa de síntesis de poli(G) con respecto al ensayo descrito en el apartado 4.23.2 de Materiales y Métodos, en presencia o ausencia de los distintos componentes indicados. Los valores relativos de actividad son el resultado de al menos 3 experimentos independientes; se dan las desviaciones estándar. En la parte inferior se muestra un ensayo representativo. “C-” ausencia de 3D.

5.2.2 Actividad enzimática de las polimerasas 3D, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(2M) y 3D(3M)

Se determina la actividad de las enzimas purificadas mediante ensayos estándar puestos a punto en nuestro laboratorio que permiten comparar unidades de actividad de polimerización. Se realiza un ensayo de polimerización de poli(U) en el cual se emplea una molécula homopolimérica de poli(A) como molde de la reacción y un oligonucleótido de 15 residuos de desoxitimidina [oligo(dT)₁₅] como iniciador (apartado 4.23.1). El ensayo de polimerización de poli(G) se realiza como se detalla anteriormente en ausencia de cebador (apartado 4.23.2). Los resultados (**Tabla 5.8**) muestran que la actividad de 3D(P169S) y 3D(M296I) no es diferente de 3D *wt*; sin embargo la polimerasa 3D(2M) [menor síntesis de poli(G)], 3D(3M) y 3D(P44S) [menor síntesis de poli(U) y poli(G)], tienen defectos en polimerización con respecto a 3D *wt*. En el caso de 3D(P44S), la actividad es de hasta 14 veces menor que la de 3D *wt* en el ensayo de polimerización de poli(G).

También se ha analizado la uridilación del péptido VPg del VFA por parte de las polimerasas mutantes y *wt*. El péptido VPg es la molécula que actúa como cebador de la replicación viral *in vivo* (apartado 2.5 de Introducción). El ensayo (apartado 4.23.3 de Materiales y Métodos) emplea una molécula de poli(A) como molde y un péptido sintético que

presenta la secuencia de la VPg-1 del VFA como molécula aceptora. En este caso, 3D(P44S) muestra una disminución significativa con respecto a 3D en la actividad de uridilación del péptido VPg (Tabla 5.8).

Tabla 5.8 Actividad relativa de las polimerasas 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I) y 3D(3M).

POLIMERASA EXPRESADA ^a	ACTIVIDAD RELATIVA		
	Polimerización de poli(U) ^b	Polimerización de poli(G) ^c	Uridilación del péptido VPg ^d
3D <i>wt</i>	100 ±5	100±18	100±5
3D(P44S)	48±9	7±3	63±16
3D(P169S)	113±17	90±29	95±20
3D(M296I)	115±12	106±23	113±9
3D(2M)	107±15	69±11	94±17
3D(3M)	65±10	49±19	108±24

^a Las polimerasas de VFA fueron expresadas en *E. coli* BL21 y purificadas por cromatografía de afinidad como se describe en los apartados 4.20 y 4.21 de Materiales y Métodos. 3D *wt* es la polimerasa de C-S8c1, 3D(P44S) es la polimerasa 3D con la sustitución P44S, 3D(P169S) es la polimerasa 3D con la sustitución P169S, 3D(M296I) es la polimerasa 3D con la sustitución M296I, 3D(2M) es la polimerasa 3D con las sustituciones P44S y M296I, y 3D(3M) es la polimerasa 3D con las sustituciones P44S, P169S y M296I.

^b La actividad relativa está medida como porcentaje respecto a la actividad específica de 3D *wt* en el ensayo de polimerización de poli(U) indicada en el apartado 4.23.1 de Materiales y Métodos (161±8 pmol UMP incorporado/min x µg de enzima).

^c La actividad relativa está medida como porcentaje respecto a la actividad específica de 3D *wt* en el ensayo de polimerización de poli(G) indicada en el apartado 4.23.2 de Materiales y Métodos (42±8 pmol GMP incorporado/min x µg de enzima).

^d La actividad relativa está medida como porcentaje respecto a la actividad específica de 3D *wt* en el ensayo de uridilación de VPg indicada en el apartado 4.23.3 de Materiales y Métodos (0,43±0,02 pmol UMP incorporado/min x µg de enzima).

Se muestra el promedio de al menos 5 determinaciones independientes en cada experimento; se dan las desviaciones estándar.

Estos resultados muestran que la sustitución P44S en la polimerasa de VFA 3D afecta negativamente la actividad de esta enzima medida como síntesis de poli(U), síntesis de poli(G) y uridilación del péptido VPg, aunque cuando está acompañada de otras sustituciones (M296I ó M296I y P169S), la actividad enzimática se recupera.

5.2.3 Afinidad de las polimerasas a un molde heteropolimérico de RNA

Para investigar si las mutaciones introducidas en 3D afectan a la unión a RNA, se realizan ensayos de retardo en gel con un RNA heteropolimérico sym/sub AUGC (apartado 4.24 de Materiales y Métodos) y cantidades crecientes de 3D *wt* o de polimerasa mutante, tal y como se describe en el apartado 4.25 de Materiales y Métodos.

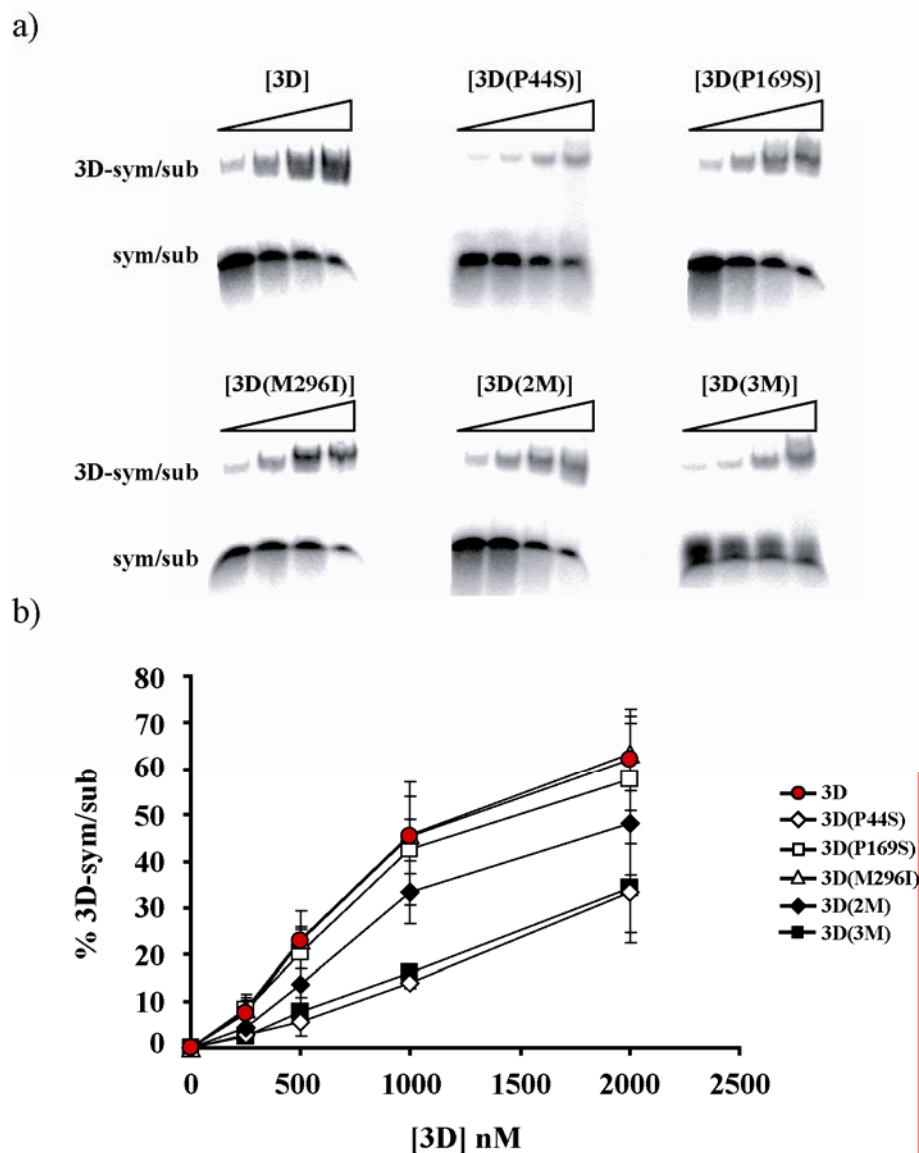


Figura 5.10 Análisis de la unión al RNA sym/sub AUGC de 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). **a)** Patrones de los gels de retardo obtenidos con las polimerasas 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). **b)** Porcentaje del complejo sym/sub-3D formado en función de la concentración de cada una de las 6 proteínas ensayadas. Los valores mostrados son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes; se dan las desviaciones estándar. El RNA libre y en complejo con 3D se cuantifica como se detalla en el apartado 4.25 de Materiales y Métodos. El RNA sym/sub AUGC (20 nM) se marca con ^{32}P en el extremo 5' y se hibrida tal y como se detalla en los apartados 4.24.1 y 4.24.2, respectivamente, de Materiales y Métodos.

Los resultados (**Figura 5.10**) muestran que 3D(M296I) y 3D(P169S) producen un retardo similar a 3D *wt*. Así, con una concentración 2 μM de 3D(M296I), 3D(P169S) y 3D *wt*, se observan retardos del $63\pm 8\%$, $58\pm 12\%$ y $62\pm 11\%$ (**Figura 5.10**). 3D(2M) muestra un retardo levemente menor ($48\pm 8\%$) mientras que 3D(P44S) y 3D(3M) presentan claramente menor unión al RNA sym/sub AUGC que 3D *wt* ($33\pm 11\%$ y $34\pm 10\%$, respectivamente, **Figura 5.10**). Por lo tanto, la sustitución P44S afecta negativamente la unión entre la polimerasa y el RNA, tanto si se encuentra sola como acompañada de otras sustituciones en la polimerasa. Esta podría ser la causa de que se las polimerasas 3D(P44S), 3D(2M) y 3D(3M) tengan valores de actividad enzimática menores que 3D como se describe en el apartado 5.2.2.

5.2.4 Efecto de las distintas sustituciones estudiadas en la polimerasa de VFA en la incorporación de ribavirina-5'-monofosfato (RMP)

Con el fin de analizar el efecto de las mutaciones P44S, P169S y M296I en 3D sobre la capacidad de discriminar RTP, se realizaron varios ensayos bioquímicos con las polimerasas 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M).

5.2.4.1 Ensayos de extensión en moldes homopoliméricos

Para evaluar la incorporación relativa de RMP, se realizan ensayos de extensión de moldes homopoliméricos en primera instancia.

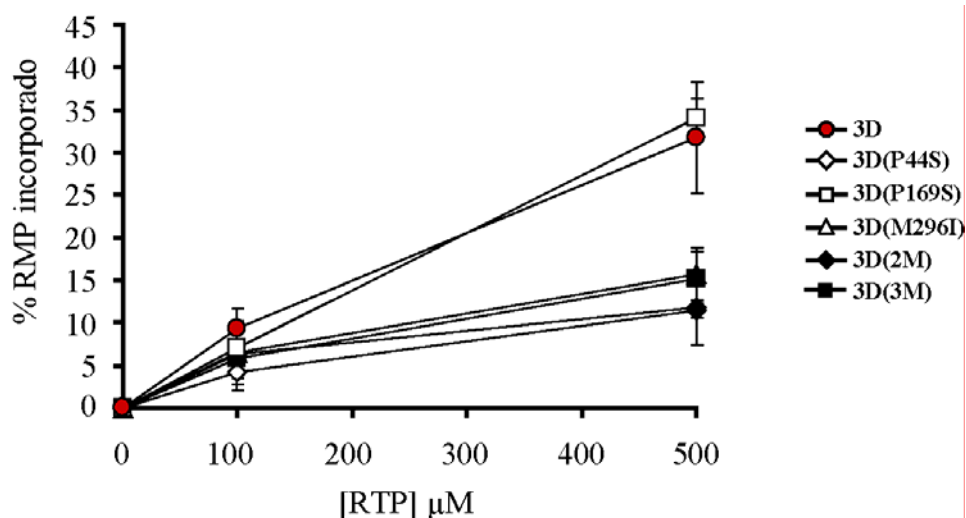


Figura 5.11 Incorporación de RMP relativa a GMP por 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M) empleando poli(C) como molde: Se muestra la incorporación de RMP relativa en relación al nucleótido correcto (GMP) por 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). La reacción se lleva a cabo en presencia de RTP 100 y 500 μM . Se representa la incorporación de RMP (% de RMP incorporado respecto a la suma de la incorporación de RMP y GMP) en función de la concentración de RTP. Los valores son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes; se dan las desviaciones estándar. Los procedimientos de incorporación en

moldes homopoliméricos y el análisis de transferencia de marca por “vecino próximo” se detallan en el apartado 4.27 de Materiales y Métodos.

Se cuantifica la incorporación relativa de RMP y GMP empleando poli(C)-oligo(dG)₁₅ como molde-iniciador, [α -³²P] GTP y concentraciones crecientes de RTP como sustrato. Estos ensayos, a diferencia del ensayo de actividad de poli(G) mostrado en el apartado 5.2.2, se realizan en presencia de cebador, ya que la polimerización *de novo* de poli(G) utilizando poli(C) como molde en presencia de 1 nM GTP es ineficiente.

A 100 μ M RTP, no se observan diferencias claras entre las distintas polimerasas estudiadas. Sin embargo, a 500 μ M RTP se observa que las polimerasas 3D(P44S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M) muestran una menor incorporación de RMP relativa a GMP que 3D *wt* (12 \pm 1%, 16 \pm 3%, 12 \pm 4%, 15 \pm 3% y 32 \pm 7%, respectivamente; **Figura 5.11**). La proteína 3D(P169S) no muestra ninguna diferencia apreciable en la incorporación relativa de RMP con respecto a la proteína 3D *wt*, ni siquiera a 500 μ M RTP (comparar 34 \pm 3% con 32 \pm 7%; **Figura 5.11**).

5.2.4.2 Ensayos de extensión en moldes heteropoliméricos

Recientemente, el Dr. Armando Arias, en colaboración con el grupo del Dr. Craig Cameron, ha demostrado que la polimerasa de VFA incorpora eficientemente RMP enfrente de C o de U en el molde de RNA (Arias et al., 2008). Para ello se utilizan moléculas RNA de tipo sym/sub como híbrido molde-cebador [(Arnold & Cameron, 2000), apartado 4.23 de Materiales y Métodos]. Se cuantifica la incorporación en la posición +2 del molde a distintos tiempos de reacción tras la formación previa del complejo ternario (3D-sym/sub-nucleótido sustrato de la posición +1 del molde) (Arias et al., 2008).

Para estudiar el comportamiento de RTP como sustrato de las 3D mutantes presentadas en esta Tesis Doctoral, se han realizado experimentos similares a los que se detallan en (Arias et al., 2008). Se han utilizado sym/sub AUGC y ACGU que permiten interrogar la incorporación en la posición +2 de A (AUGC) o de G (ACGU), respectivamente. De la misma forma, permiten comparar la incorporación de RMP frente a U (AUGC) o frente a C (ACGU) (ver Materiales y Métodos, apartado 4.26, **Figura 4.6**).

Los resultados indican una rápida incorporación de los nucleótidos correctos: A en la posición +2 de sym/sub AUGC y de G en la posición +2 de sym/sub ACGU (**Figura 5.12** y **Figura 5.13**, respectivamente). Con todas las polimerasas ensayadas se observa extensión hasta posición +3 a 600 s, indicando que a tiempos largos se produce probablemente la incorporación incorrecta de UMP frente a G en el molde (AUGC y ACGU). Por ello, en todos los experimentos realizados se ha calculado la cantidad de cebador elongado en 2 o más residuos (\geq +2) con respecto a la cantidad de iniciador no elongado. Para todas las enzimas ensayadas, se obtiene una cantidad comparable de producto elongado 22 \pm 2%, 21 \pm 1%, 20 \pm 3%, 23 \pm 4%, 22 \pm 0% y 24 \pm 1% para 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M), respectivamente, a 600 s utilizando el molde sym/sub AUGC. La extensión utilizando el molde sym/sub ACGU es 17 \pm 0%, 15 \pm 1%, 16 \pm 1%, 17 \pm 1%, 16 \pm 2% y 17 \pm 2%, respectivamente. Este

resultado sugiere que las mutaciones P44S, P169S y M296I no afectan gravemente a la incorporación de nucleótidos correctos en el RNA por 3D de VFA.

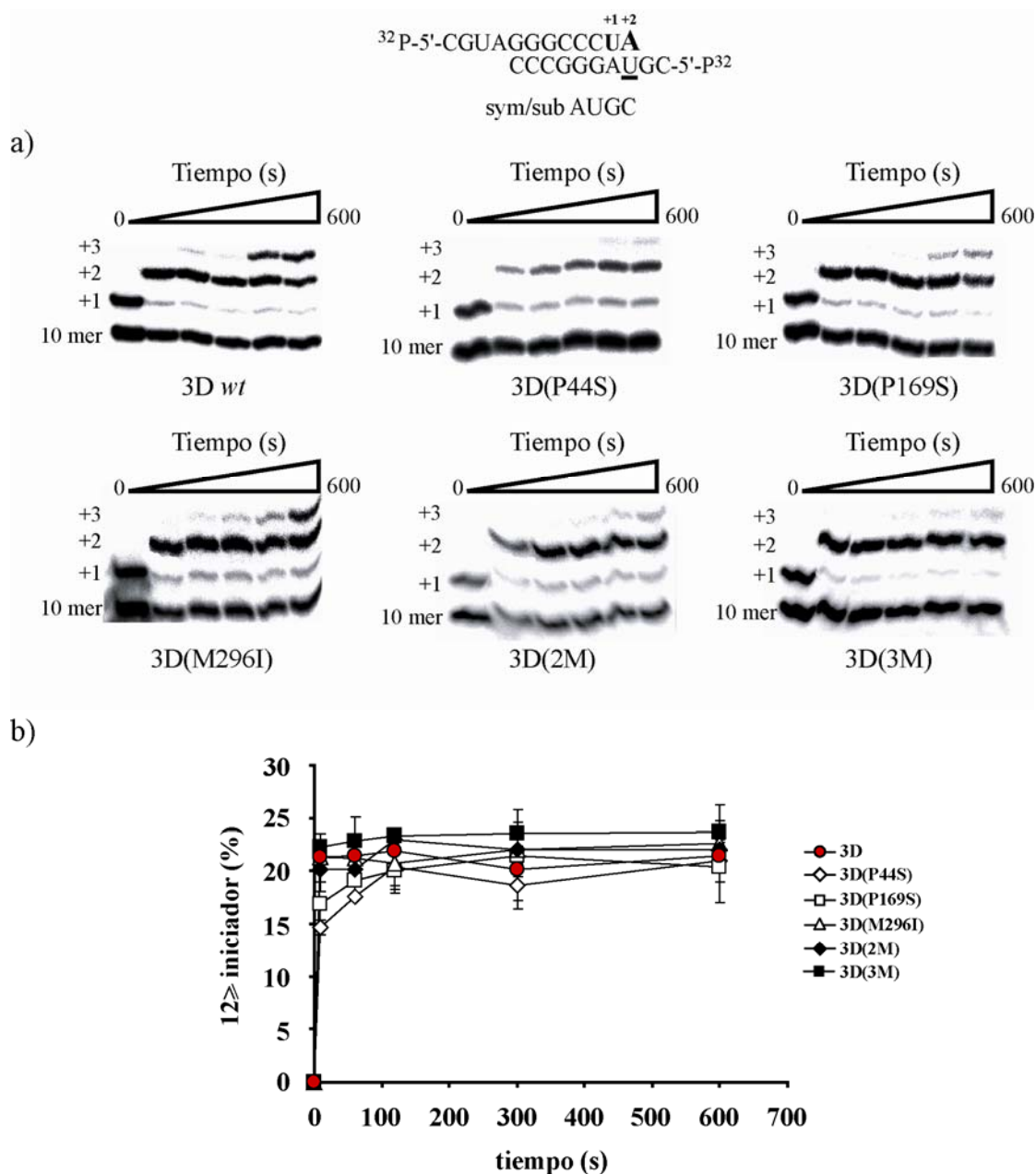


Figura 5.12. Incorporación de AMP en la posición +2 de sym/sub AUGC. Se indica la secuencia del molde heteropolimérico empleado, sym/sub AUGC, marcado con ^{32}P en el extremo 5'. Se subraya la base (posición +2) que sirve como molde en el ensayo. Se indica la U en la posición +1 que se incorpora durante el tiempo de preincubación y la A que sirve como sustrato durante el ensayo. **a)** Análisis electroforético por PAGE desnaturalizante de los productos de reacción, tras la incorporación a diferentes tiempos de AMP por las polimerasas 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). **b)** Gráfica de la cinética (0, 10, 60, 120, 300, 600 s) de la incorporación relativa de AMP en el sym/sub AUGC por 3D, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). Los resultados son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes. Se muestran las desviaciones estándar. Los procedimientos del ensayo se detallan en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos.

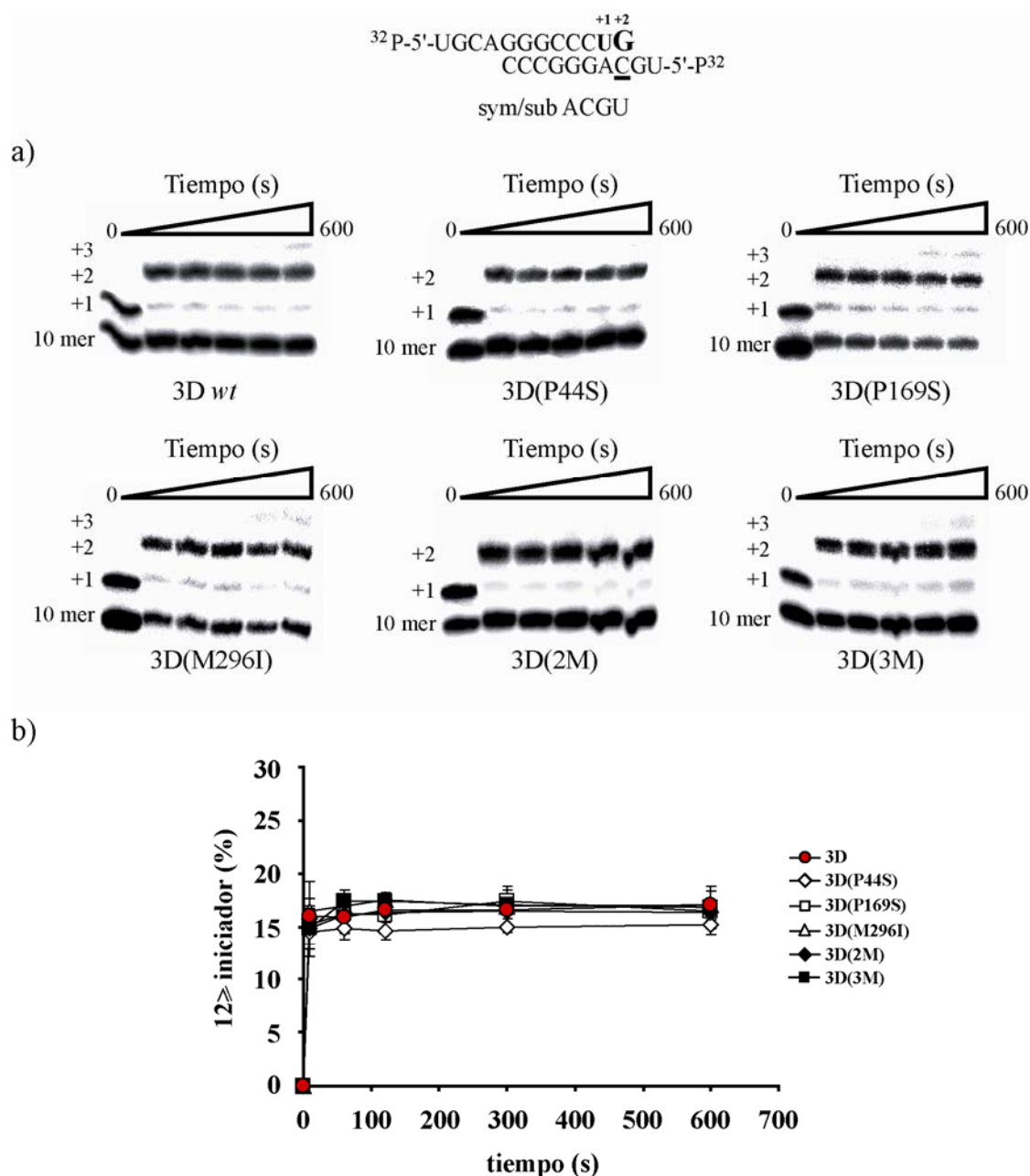


Figura 5.13. Incorporación de GMP en la posición +2 de sym/sub ACGU. Se indica la secuencia sym/sub ACGU, marcado con ^{32}P en el extremo 5'. Se subraya la base de la posición +2 que sirve como molde en el sym/sub correspondiente. Se resalta la U que se incorpora en posición +1 durante el tiempo de preincubación y la G que sirve como sustrato durante el ensayo **a)** Análisis electroforético por PAGE desnaturalizante de los productos de incorporación de incorporación de AMP por las polimerasas 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M) a diferentes tiempos. **b)** Gráfica de la cinética (0, 10, 60, 120, 300, 600 s) de la incorporación relativa de AMP en el sym/sub AUGC por 3D, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). Los resultados son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes. Se muestran las desviaciones estándar. Los procedimientos de extensión de moldes heteropoliméricos se detallan en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos.

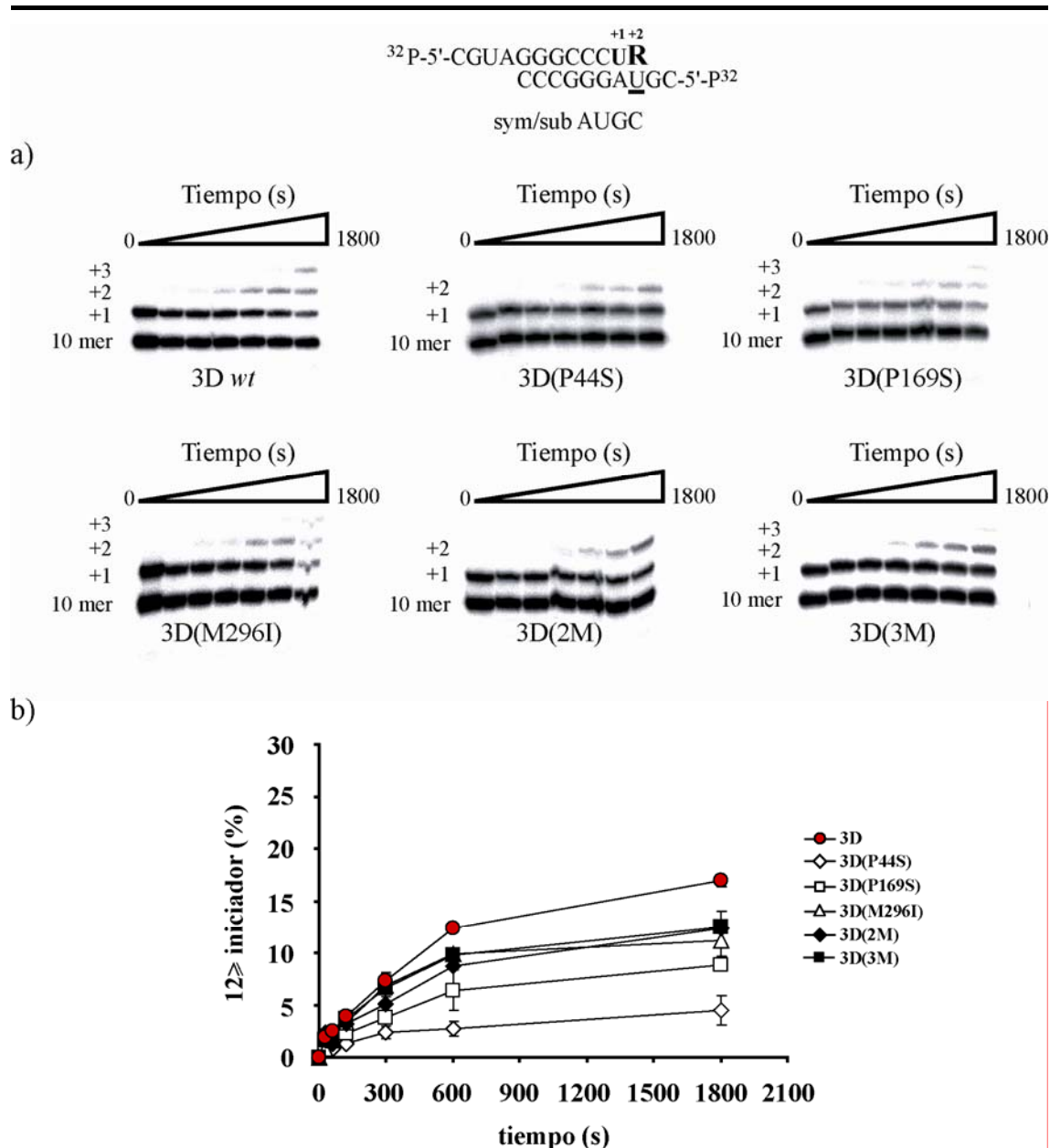


Figura 5.14. Incorporación de RMP en la posición +2 de sym/sub AUGC. Se indica la secuencia sym/sub AUGC empleado. Se indica subrayado la base de la posición +2 que sirve como molde. Se resalta la U que se incorpora en la posición +1 durante el tiempo de preincubación y la R que sirve como sustrato durante el ensayo. **a)** Análisis electroforético de la cinética de incorporación de RMP por las polimerasas 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). **b)** Gráfica de la cinética (0, 30, 60, 120, 300, 600, 1800 s) de la incorporación relativa de RMP en el sym/sub AUGC por 3D, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). Se representa el promedio de al menos 3 determinaciones independientes. Se muestran las desviaciones estándar. Los procedimientos de extensión de moldes heteropoliméricos se detallan en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos.

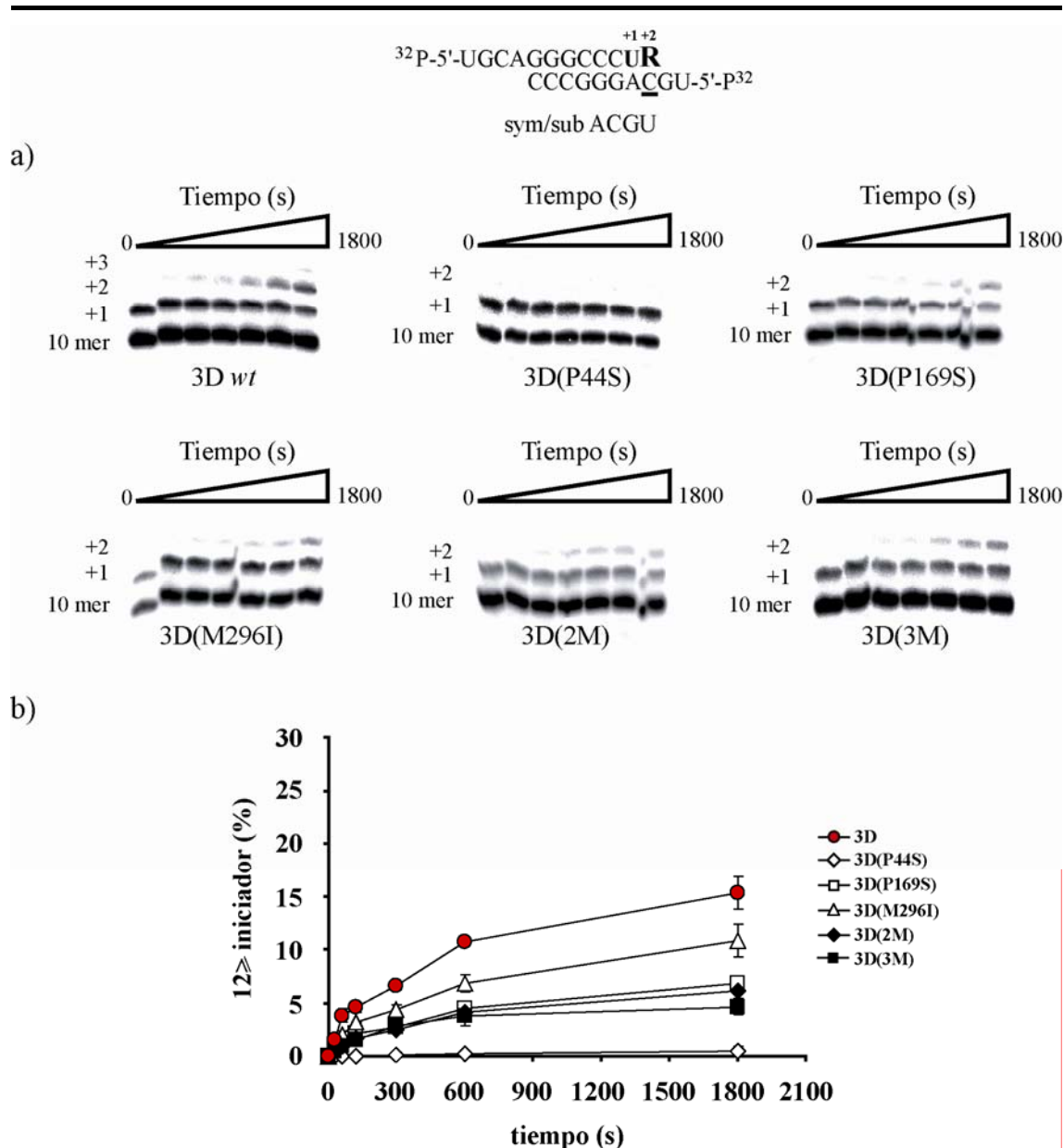


Figura 5.15. Incorporación de RMP en la posición +2 de sym/sub ACGU. Se indica la secuencia del molde heteropolimérico sym/sub ACGU. Se subraya la base de la posición +2 que sirve como molde. Se resalta la U que se incorpora en la posición +1 durante el tiempo de preincubación y la R que sirve como sustrato durante el ensayo. **a)** Análisis de los productos de incorporación de RMP en sym/sub ACGU, catalizado por las polimerasas 3D, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). **b)** Gráfica de la cinética (0, 30, 60, 120, 300, 600, 1800 s) de incorporación de RMP en el sym/sub ACGU por 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). Los resultados mostrados son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes. Se muestran las desviaciones estándar. Los procedimientos de extensión de moldes heteropoliméricos se detallan en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos.

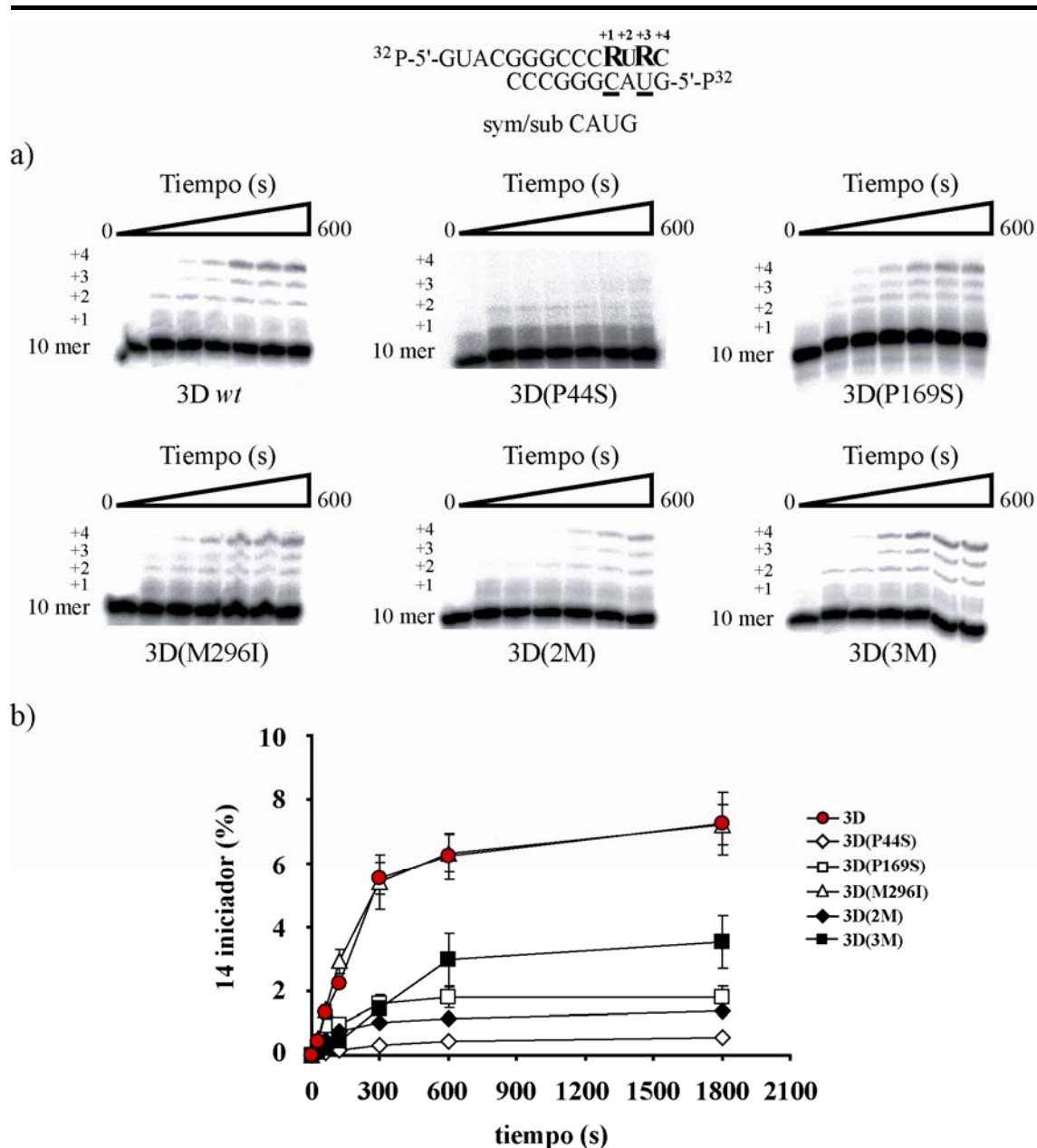


Figura 5.16. Elongación hasta la posición +4 en sym/sub CAUG utilizando CTP, UTP y RTP. Se representa la secuencia de RNA sym/sub CAUG. Se subraan las posiciones +2 y +4 que sirven como molde de RMP. **a)** Análisis electroforético de los productos de elongación por las polimerasas 3D *wt*, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M). **b)** Representación gráfica de la cinética de la elongación de sym/sub CAUG por 3D, 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M) a diferentes tiempos (0, 30, 60, 120, 300, 600, 1800 s). Se muestran las desviaciones estándar de al menos 3 determinaciones independientes. Los procedimientos de extensión de moldes heteropoliméricos con se detallan en la sección 4.26 de Materiales y Métodos.

Se ha evaluado la incorporación de RMP como sustrato de 3D de VFA, empleando sym/sub AUGC. Los resultados (**Figura 5.14**) muestran que 3D *wt* de VFA es capaz de extender una mayor cantidad de cebador ($17 \pm 1\%$) que 3D(M296I) ($11 \pm 2\%$), 3D(P169S) ($9 \pm 1\%$) y 3D(P44S) ($5 \pm 1\%$) a 1800 s [**Figura 5.14(b)**]. Las polimerasas que contienen múltiples

sustituciones incorporan la misma cantidad de RMP que 3D(M296I) [$11\pm2\%$, $12\pm2\%$ y $13\pm1\%$ de iniciador extendido a 1800 s por 3D(M296I), 3D(2M) y 3D(3M) respectivamente, **Figura 5.14(b)**]. Por lo tanto, todas las polimerasas mutantes incorporan menos eficientemente RMP frente a U que 3D *wt*.

El estudio de la incorporación de RMP por 3D mutantes en posición +2 frente a C de sym/sub ACGU muestra nuevamente que 3D *wt* es capaz de extender más cantidad de cebador ($15\pm2\%$) que 3D(M296I) ($11\pm2\%$), 3D(P169S) ($7\pm0\%$) y 3D(P44S) ($<0,5\%$) a 1800 s (**Figura 5.15**). Este patrón de incorporación de RMP frente a C está de acuerdo con los datos obtenidos frente a U, donde la extensión de iniciador es también $3D > 3D(M296I) > 3D(P169S) > 3D(P44S)$ (Comparar **Figura 5.14** con **Figura 5.15**). Sorprendentemente en el caso de 3D(P44S), la incorporación de RMP frente a C está por debajo del límite de detección del experimento, mientras que frente a U sí es cuantificable ($5\pm1\%$). Para comprobar que el defecto no se debe al contexto de secuencia del RNA, se realizó un ensayo con utilizando el molde sym/sub CAUG [tal y como se indica en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos, **Figura 4.6(a)**] utilizando RTP como nucleótido. En este caso se vuelve a constatar que 3D(P44S) no es capaz de incorporar RMP frente a C en posición +1 del iniciador (CAUG) tras 1800 s de reacción ($<0,5\%$), mientras que 3D *wt* sí lo hace ($37\pm10\%$).

Las polimerasas 3D(2M) y 3D(3M) muestran una extensión relativa de $4\pm0\%$ y $4\pm1\%$ a 1800 s., respectivamente, que es nuevamente menor que la que se observa utilizando 3D *wt*.

RMP se incorpora menos eficientemente por todas las polimerasas mutantes estudiadas con respecto a 3D *wt* en ensayos *in vitro* utilizando un molde-iniciador de RNA heteropolimérico. Estos datos sugieren que las mutaciones surgidas en 3D durante pases a concentraciones crecientes de R, confieren resistencia a la incorporación del mutágeno durante la síntesis del RNA viral.

Adicionalmente se ha determinado la capacidad de las distintas enzimas mutantes y *wt* de elongar sym/sub CAUG hasta posición +4 mediante la incorporación de los nucleótidos UMP y CMP frente a A y G (posiciones +2 y +4) y de RMP frente a C y U (posiciones +1 y +3) [apartado 4.26 de Materiales y Métodos, **Figura 4.5(a)**]. El ensayo se realiza preincubando la enzima y sym/sub CAUG por separado e iniciando la reacción añadiendo CTP, UTP y RTP tal y como se detalla en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos. Se cuantifica la cantidad de producto extendido hasta posición +4.

Los resultados (**Figura 5.16**) muestran que tanto 3D *wt* como 3D(M296I) presentan la misma capacidad de extender cebadores utilizando RMP ($7\pm1\%$ y $7\pm1\%$ a 1800 s, respectivamente), sin embargo el resto de mutantes tienen una menor capacidad de elongación de sym/sub CAUG [$1\pm0\%$, $2\pm0\%$, $1\pm0\%$ y $4\pm1\%$ por 3D(P44S), 3D(P169S), 3D(2M) y 3D(3M), respectivamente]. Por lo tanto, en este caso, la sustitución M296I no afecta en la utilización de RMP por 3D durante la elongación del RNA. Sin embargo, las sustituciones P44S y P169S sí afectan la capacidad de elongación de la polimerasa. Curiosamente en este caso, la polimerasa 3D(P44S) es capaz de elongar el iniciador utilizando RMP frente a G [comparar posición +2 del panel 3D(P44S) en **Figuras 5.15(a)** y **5.16(a)**].

5.3 Caracterización biológica de un mutante de VFA que presenta resistencia a ribavirina mediante una mutación en 2C

5.3.1 Análisis de la secuencia consenso de la población R-3Mp10

Experimentos preliminares mediante cinéticas de síntesis RNA viral intracelular en presencia de 5000 μ M R (**Figura 5.17**) nos han hecho pensar en la posibilidad de que R ejerza efecto inhibitorio en etapas iniciales de la replicación de VFA. Además, durante el tratamiento de pMT28-3D(3M) en presencia de 5000 μ M R (ver apartado 5.1.12), la población viral pierde infectividad hasta el pase 7, pero a partir de ese momento recupera la infectividad con los pases y alcanza un título viral de $1,8 \times 10^4$ PFU/ml en el pase 10 (**Figura 5.7**). Resultaba interesante determinar si alguna nueva mutación ha surgido durante el tratamiento con R.

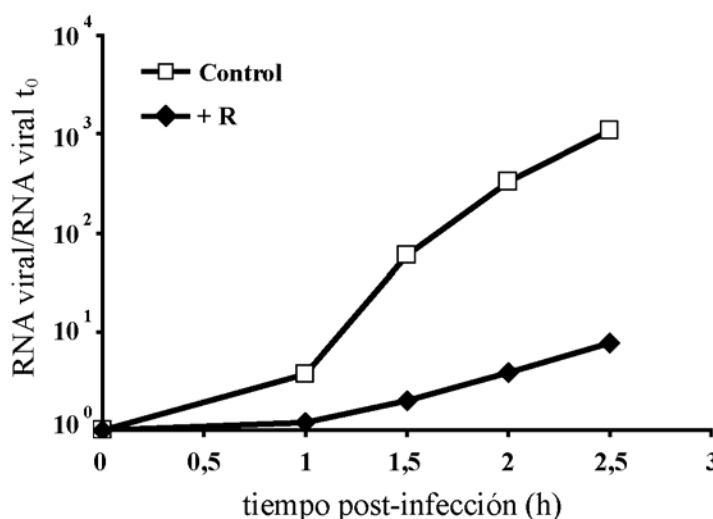


Figura de 5.17. Cinética de la síntesis de RNA viral intracelular en presencia y ausencia de R. Se infectan células BHK-21 a una m.d.i. de 0,5 UFPs/célula en presencia o ausencia de 5000 μ M R con virus producido a partir de pMT28. Se realiza una infección independiente para cada uno de los puntos recogidos. El procedimiento para infecciones en medio líquido en ausencia y presencia de drogas, extracción del RNA viral intracelular y cuantificación del mismo se describen en los apartados 4.4.1, 4.4.2, 4.5.2 y 4.9, respectivamente, de Materiales y Métodos.

El análisis de la secuencia consenso del genoma completo de la población R-3Mp10 [población viral derivada de pMT28-3D(3M) pasada 10 veces en presencia de 5000 μ M R, apartado 5.1.10] muestra únicamente la mutación U5087C que codifica el cambio de aminoácido I248T en la proteína 2C de VFA (**Figura 5.18**). Esta mutación no aparece en la secuencia consenso de la población inicial 3Mp0 ni tampoco en la población de VFA MARLS R-Ap60. Al someter a la población R-3Mp10 a 5 pases adicionales en ausencia de R, se observa que en la posición 5087 aparece en mezcla el cambio C5087A/C que produce la pseudorreversión T248N en 2C. La secuencia de las poblaciones virales R-3Mp2, R-3Mp4, R-

3Mp6, R-3Mp8 y R-3Mp10 (**Figura 5.18**) muestra que U5087C se va imponiendo a lo largo de los pases y solamente cuando C domina sobre U, la población R-3M empieza a recuperar título viral. Todos estos resultados sugieren que U5087C ha surgido como respuesta al tratamiento con altas concentraciones de R y es responsable de la recuperación de infectividad de VFA.

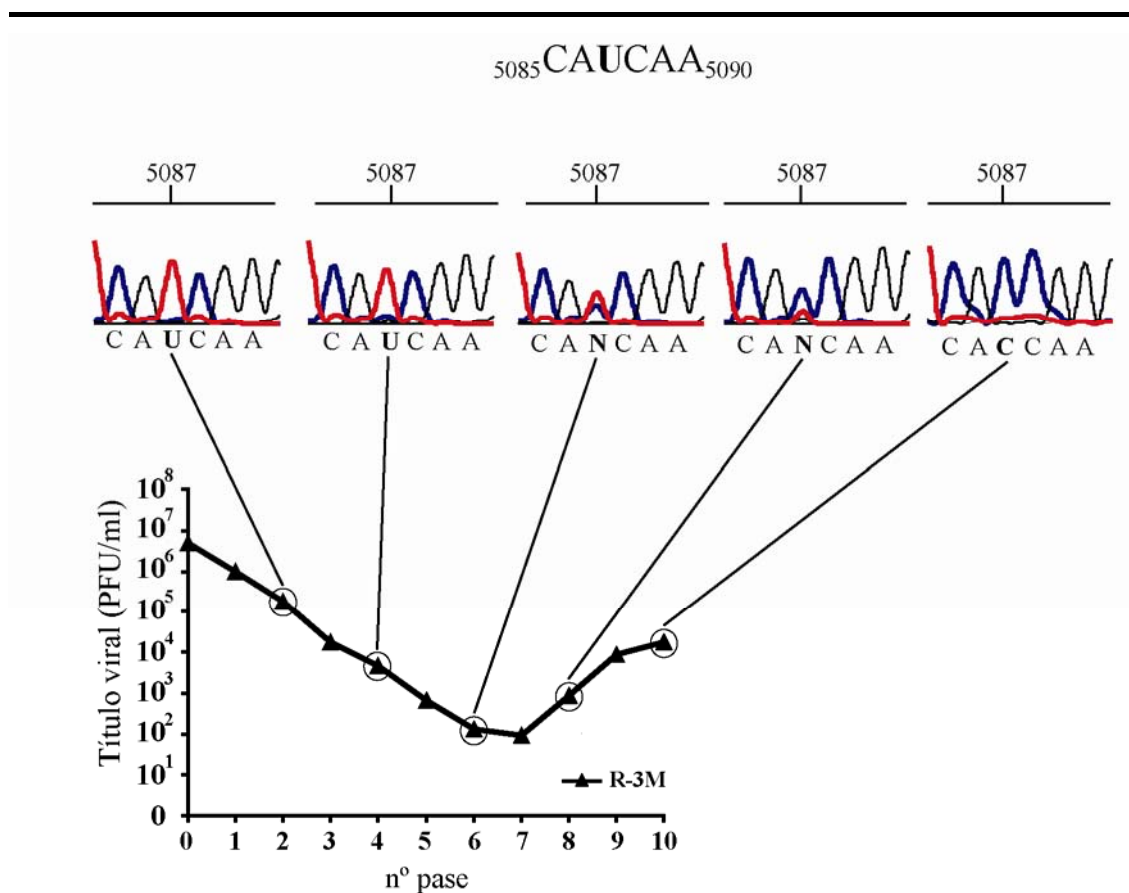


Figura 5.18 Análisis de la secuencia consenso en torno a la posición 5087 del genoma en los virus R-3Mp2, R-3Mp4, R-3Mp6, R-3Mp8 y R-3Mp10. Se muestra el cromatograma de la secuencia consenso de las poblaciones virales R-3Mp2, R-3Mp4, R-3Mp6, R-3Mp8 y R-3Mp10. La posición 5087 del genoma, U para el virus *wt* (pMT28) (rojo en el cromatograma) y C para los mutantes (azul en el cromatograma), se resalta en negrita. “N” indica mezcla de nucleótidos. Se muestra la infectividad de la población 3M a lo largo de los pases y se indica con un círculo las poblaciones que han sido secuenciadas. La extracción de RNA vírico se detalla en el apartado 4.5.1 de Materiales y Métodos. La obtención de cDNA a partir del RNA y su posterior secuenciación, se detalla en los apartados 4.6 y 4.8, respectivamente, de Materiales y Métodos.

5.3.2 Análisis biológico del clon infeccioso con la mutación C5087U en presencia y ausencia de R

Los resultados mostrados en el apartado 5.3.1 indican que una única mutación fuera de la región 3D parece responsable de la recuperación de infectividad en R-3M durante tratamiento con 5000 μ M R. Se ha estudiado el papel que ejerce esta mutación en la resistencia a R en solitario. Para ello se utiliza el plásmido pMT28-2C(I248T) (Apartado 4.2.2. de Materiales y

Métodos), previamente construido en nuestro laboratorio por Marta Sanz Ramos (Sanz-Ramos et al., 2008).

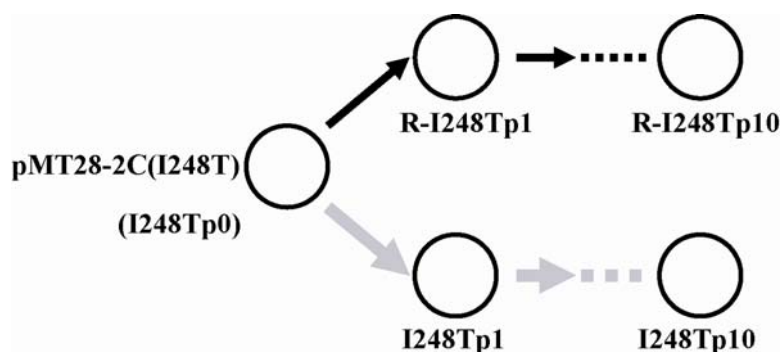


Figura 5.19 Esquema de los pases seriados del virus pMT28-2C(I248T) en presencia y ausencia de 5000 μM R. El virus pMT28-2C(I248T) así como las poblaciones virales resultantes tras los pases se representan como círculos blancos. Las flechas negras representan pases en presencia de 5000 μM R, las flechas grises gruesas representan pases en ausencia de R. Las poblaciones denominadas I248T y R-I248T derivan del virus pMT28-2C(I248T) pasado en presencia o ausencia de 5000 μM R, respectivamente. La letra “p” seguida de un número indica el número de pase de la población correspondiente. El origen de los virus utilizados así como los procedimientos para la realización de infecciones de VFA en medio líquido se encuentran en los apartados 4.2.2 y 4.4 de Materiales y Métodos.

Se realizan 10 infecciones seriadas tanto en presencia y ausencia de 5000 μM R como se describe para pMT28 y pMT28-3D(3M) en el apartado 5.1.10 de Resultados. El esquema de los pases realizados se representa en la **Figura 5.19**. De este modo, se obtienen las poblaciones I248T a partir de pases seriados en ausencia de R, y las poblaciones R-I248T a partir de los pases seriados en presencia de 5000 μM R.

5.3.3 Infectividad de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T) en presencia y ausencia de R.

Se determina la infectividad de cada uno de los pases realizados a partir del virus pMT28-2C(I248T) en presencia y ausencia de R (**Figura 5.20**). El título viral de las poblaciones no tratadas con R se mantiene constante a lo largo de los pases con una relación de PFU/ml similar a la que tienen las poblaciones virales derivadas de pMT28 no tratadas con R (**Figura 5.20**). En presencia de 5000 μM R, el título viral de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T) (poblaciones R-I248T) muestra un continuo descenso hasta la población R-I248Tp9, donde no se detecta infectividad por plaqueo [<5 PFU/ml; **Figura 5.20(b)** cuadrados negros], pero se recupera virus tras 2 pases sucesivos de R-I248Tp9 en células BHK-21. Se obtiene el mismo resultado a partir del sobrenadante de la población R-I248Tp10. Por tanto, el virus 2C(I248T) no se extingue tras 10 pases en presencia de 5000 μM R, a diferencia de Wt, que se extingue en 7 pases [**Figura 5.20(a)**].

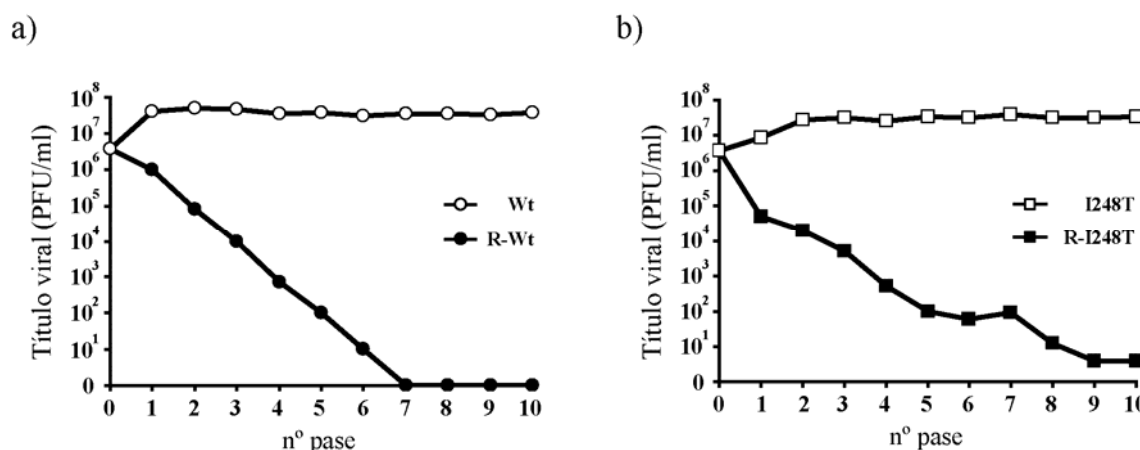


Figura 5.20 Infectividad de las poblaciones virales derivadas de pMT28-2C(I248T) en presencia o ausencia de 5000 µM R. Se representa el título viral (PFUs/ml) a lo largo de 10 pases de las poblaciones derivadas de pMT28 (Wt) (a) mostrados como comparación, y poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T) (I248T) (b) en células BHK-21 en presencia o ausencia de R. Los sobrenadantes de las distintas infecciones siempre se recogieron a las 24 h postadsorción. Los símbolos blancos muestran la infectividad de las poblaciones Wt o I248T pasadas en ausencia de R. Los símbolos negros muestran la infectividad de las poblaciones pasadas en presencia de 5000 µM R, R-Wt y R-I248T. El origen de los virus utilizados así como los procedimientos para la realización de infecciones de VFA en medio líquido y en medio semisólido se encuentran en los apartados 4.2.2 y 4.4, respectivamente, de Materiales y Métodos.

5.3.4 Análisis de la infectividad específica de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T)

La población derivada de pMT28-2C(I248T) tratada con R no se extingue mediante mutagénesis letal. Como se ha indicado anteriormente (apartado 2.2 de Introducción) la entrada de la replicación viral en catástrofe de error conlleva una disminución de la infectividad específica a lo largo del proceso. Para determinar la variación de infectividad específica de las poblaciones I248T y R-I248T, se calcula la proporción de partículas infecciosas por genoma a lo largo de los pases tanto en presencia como en ausencia de R (**Figura 5.21**).

Los resultados muestran que la infectividad específica de las poblaciones no tratadas con R (población I248T) se mantiene constante a lo largo de los pases, mientras que en el caso de las poblaciones tratadas con la droga (poblaciones R-I248T) se observa una oscilación en la infectividad específica, aunque en la población final R-I248Tp8 es más de la mitad de la infectividad específica de la población original pMT28-2C(I248T) (4×10^{-6} comparado con 7×10^{-6} PFUs/nº moléculas; **Figura 5.21**). La infectividad específica de las poblaciones I248T y R-I248T no varía significativamente a lo largo de los pases, comportándose como la población Wt no tratada con R, demostrando que la resistencia a la extinción se corresponde con el mantenimiento de la infectividad específica a lo largo de los pases.

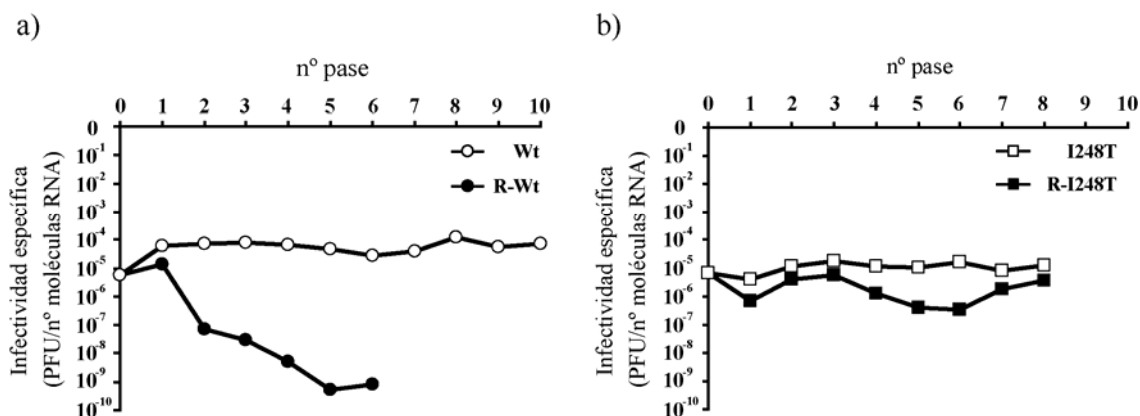


Figura 5.21 Infectividad específica de las poblaciones pMT28-2C(I248T) y Wt en presencia o ausencia de 5000 μ M R. Infectividad específica medida como PFUs/n° moléculas de RNA de las poblaciones Wt (a), mostrados como comparación, e I248T (b) en células BHK-21. Se utilizan los datos de título viral mostrados en la **Figura 5.20**. No se ha calculado la infectividad específica de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(248T) tratadas con R a partir de R-I248Tp9 debido a que no se puede cuantificar el título viral de estas poblaciones. La extracción y cuantificación del RNA viral total de cada una de las poblaciones se detalla en los apartados 4.5.1 y 4.9, respectivamente, de Materiales y Métodos. Los símbolos blancos muestran la infectividad específica de las poblaciones pasadas en ausencia de R, Wt y 2C(I248T). Los símbolos negros muestran la infectividad específica de las poblaciones pasadas en presencia de 5000 μ M R, R-Wt y R-I248T.

5.3.5 Frecuencia de mutación de una población derivada de pMT28-2C(I248T) pasada en presencia y ausencia de R

A partir del RNA viral obtenido de I248Tp4 y R-I248Tp4, se ha realizado un análisis del espectro de mutantes de las poblaciones. Se obtienen frecuencias de mutación máximas de 6×10^{-4} y 24×10^{-4} s/nt para las poblaciones I248T y R-I248T, respectivamente, (5 y 20 mutaciones por genoma, respectivamente) (**Tabla 5.9**). El número de mutaciones encontrado en I248Tp4 no es significativamente diferente del encontrado en la población Wtp5 ($t = 0,41$ $P > 0,1$). El número de mutaciones encontrado en R-I248Tp4 es mayor que en el espectro de mutantes de R-Wtp4, (24×10^{-4} frente a 19×10^{-3} s/nt) aunque la diferencia no es significativa ($t = 1,61$ $P > 0,05$); en cambio, sí que es significativamente mayor que el número de mutaciones encontrado en R-3Mp4, la población con la polimerasa 3D con 3 mutaciones de resistencia ($t = 4,49$ $P < 0,005$; **Tabla 5.9**). Por tanto, la frecuencia de mutación en un virus que codifica la proteína 2C(I248T) no es menor que el virus *wt* en presencia de R, indicando que la resistencia de la población R-I248T a R no es debida a una menor frecuencia de mutación.

Tabla 5.9 Frecuencia de mutación máxima de los espectros de mutantes de las poblaciones I248Tp4 y R-I248Tp4.

POBLACIÓN ^a	Sin R		Con R	
	FRECUENCIA DE MUTACIÓN ^b	MUTACIONES POR GENOMA ^c	FRECUENCIA DE MUTACIÓN ^b	MUTACIONES POR GENOMA ^c
I248T	6×10^{-4}	5	24×10^{-4}	20
3M	4×10^{-4}	3	13×10^{-4}	11
Wt	6×10^{-4}	5	19×10^{-4}	16

Para el análisis de los espectros de mutantes se han secuenciado 28455 nucleótidos en la población I248Tp4 y 29810 en la población R-I248Tp4. La zona secuenciada está comprendida entre los nucleótidos 6610 y 8020.

^a “Wt” hace referencia a la población Wtp5, en el caso “Sin R”, y R-Wtp4, en el caso “Con R”. “3M” hace referencia a la población 3Mtp5, en el caso “Sin R”, y R-3Mtp4, en el caso “Con R”. “I248T” hace referencia a la población I248Tp4, en el caso “Sin R”, y R-I248Tp4, en el caso “Con R”.

^b La frecuencia de mutación máxima está expresada como número de mutaciones diferentes encontradas con respecto al número total de nucleótidos secuenciados (apartado 4.17 de Materiales y Métodos).

^c El número de mutaciones por genoma se calcula a partir de la frecuencia de mutación estimando que el genoma de VFA tiene 8300 nucleótidos.

Los valores de frecuencia de mutación de las poblaciones Wtp5, 3Mtp5, R-Wtp4 y R-3Mtp4 son los mismos que se muestran en la **Tabla 5.6**, y se representan aquí a modo de comparación. Los protocolos de extracción de RNA viral total así como el método de clonaje del cDNA de cada una de las poblaciones se detallan en los apartados 4.5 y 4.10.2, respectivamente, de Materiales y Métodos.

5.3.5.1 Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T)

Para comprobar si al igual que ocurre con la población 3M, hay una distribución alterada de los tipos de transiciones, se ha determinado la frecuencia de transición (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) de las poblaciones I248Tp4 y R-I248Tp4 (**Tabla 5.10**). En ambos casos se comprobó que la secuencia consenso de la región 2C no se había modificado durante los pases. La frecuencia de mutaciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en la población I248Tp4 no tratada con R no difiere significativamente de las poblaciones Wtp5 ($\chi^2 = 0,69$ $P > 0,1$) ni 3Mtp5 ($\chi^2 = 0,00$ $P > 0,1$). Por lo tanto, en ausencia de R, la población I248T no muestra diferencias ni en la frecuencia de mutación (ver **Tabla 5.9**) ni en el patrón de transiciones con respecto a las poblaciones no tratadas Wt y 3M.

La frecuencia de cambios (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de R-I248Tp4 es significativamente diferente al de la población R-Wtp4 ($\chi^2 = 10,7$ $P < 0,001$), pero no con respecto a la población R-3Mtp4 ($\chi^2 = 0,76$ $P > 0,1$; **Tabla 5.10**). Además, el patrón de transiciones en la población tratada con R, R-I248Tp4 tampoco es significativamente diferente al de la población I248Tp4 ($\chi^2 = 0,08$ $P > 0,1$). Así, la proteína 2C con la sustitución I248T de VFA parece afectar al tipo de incorporaciones incorrectas que se

producen en la población. Por lo tanto, las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T) tratadas con R son resistentes a la extinción manteniendo un balance de las transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) similar al que ocurre en las poblaciones no tratadas con la droga.

Tabla 5.10 Frecuencia de las transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I28T).

POBLACIÓN	TRANSICIONES			
	(C→U)+(G→A)		(U→C)+(A→G)	
	% ^a	Frecuencia ^b	% ^a	Frecuencia ^b
Sin R				
I248Tp4	37	2,2 x 10 ⁻⁴	50	3,0 x 10 ⁻⁴
Wtp5	22	1,3 x 10 ⁻⁴	78	4,7 x 10 ⁻⁴
3Mp5	27	0,9 x 10 ⁻⁴	55	2,2 x 10 ⁻⁴
Con R				
R-I248Tp4	46	11 x 10 ⁻⁴	54	13 x 10 ⁻⁴
R-Wtp4	80	15 x 10 ⁻⁴	20	3,8 x 10 ⁻⁴
R-3Mtp4	34	4,4 x 10 ⁻⁴	63	8,2 x 10 ⁻⁴

^a Porcentaje de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones I248Tp4 y R-I248Tp4. El porcentaje de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) está expresado con respecto al total de mutaciones (transiciones y transversiones) encontradas en los correspondientes espectros de mutantes estudiados. Las frecuencias de transiciones están basadas en el análisis de los espectros de mutantes estudiados en el apartado 5.3.5.

^b Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) calculada multiplicando el porcentaje de transiciones por la frecuencia de mutación de cada una de las poblaciones indicadas (**Tabla 5.9**).

Los valores de frecuencia de transiciones de las poblaciones Wtp5, 3Mp5, R-Wtp4 y R-3Mp4 son los mismos que se muestran en la **Tabla 5.7**, y se representan aquí a modo de comparación.

5.3.6 *Fitness* relativo debido a la mutación I248T en el contexto de pMT28-3D(3M)

Los resultados obtenidos en los apartados 5.3.3 y 5.3.5 indican que un virus con la mutación U5087C que codifica la substitución I248T en la proteína 2C no se extingue en presencia de R y además mantiene constante el patrón de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G). La mutación se origina en respuesta a un tratamiento con R del virus pMT28-3D(3M) (apartado 5.3.1). Por tanto, resulta de interés saber cómo influye esta mutación en la resistencia a un tratamiento con la droga en el contexto genómico de pMT28-3D(3M).

Para ello se ha construido el plásmido pMT28-3D(4M). Se trata de un clon infeccioso que contiene la mutación U5087C en 2C en el contexto del genoma de pMT28-3D(3M). Se realizan ensayos de *fitness* coinfectando el virus pMT28-3D(4M) y el virus pMT28-3D(3M) en presencia y ausencia de 5000 µM R, tal y como se detalla anteriormente. En ausencia de R, el

virus pMT28-3D(4M) presenta una eficacia relativa 3 veces superior a pMT28-3D(3M), indicando que I248T favorece la replicación de un virus que codifica la polimerasa mutante 3D(3M). En presencia de R, pMT28-3D(4M) muestra un valor de *fitness* 5 veces superior a pMT28-3D(3M). Este valor es 2,5 veces superior al valor de eficacia biológica de pMT28-3D(3M) con respecto a pMT28 en presencia de R [Figura 5.5(b)]. Ello indica, por tanto, que I248T juega un importante papel en la resistencia del virus pMT28-3D(3M) a R.

5.3.7 Frecuencia de mutación de una población derivada de pMT28-3D(4M) pasada en presencia y ausencia de R

Para determinar la frecuencia de mutación de pMT28-3D(4M), se realizan 4 pases en ausencia y presencia de 5000 μ M R originando las poblaciones 4Mp4 y R-4Mp4 respectivamente. La frecuencia de mutación máxima es de 2×10^{-4} y 14×10^{-4} sustituciones incorrectas por nucleótido para 4Mp4 y R-4Mp4, respectivamente (Tabla 5.11). La frecuencia de mutación en ausencia de R es 3 veces inferior que en las poblaciones no tratadas Wtp5 e I248Tp4, y 2 veces inferior que la de la población 3Mp5. El número de mutaciones de la población 4Mp4 es significativamente inferior que el de la población Wtp5 e I248Tp4 ($t = 2,06$ $P < 0,01$ y $t = 1,84$ $P < 0,025$, respectivamente) mientras que es indistinguible que el de la población 3Mp4 ($t = 0,87$ $P > 0,1$).

Tabla 5.11 Frecuencia de mutación máxima de los espectros de mutantes de las poblaciones 4Mp4 y R-4Mp4.

POBLACIÓN ^a	Sin R		Con R	
	FRECUENCIA DE MUTACIÓN ^a	MUTACIONES POR GENOMA ^c	FRECUENCIA DE MUTACIÓN ^b	MUTACIONES POR GENOMA ^c
4M	2×10^{-4}	2	14×10^{-4}	12
Wt	6×10^{-4}	5	19×10^{-4}	16
3M	4×10^{-4}	3	13×10^{-4}	11
I248T	6×10^{-4}	5	24×10^{-4}	20

Para el análisis de los espectros de mutantes se han secuenciado 36530 nucleótidos en la población 4Mp4 y 29505 en la población R-4Mp4. La zona secuenciada está comprendida entre los nucleótidos 6610 y 8020.

^a “Wt” hace referencia a la población Wtp5, en el caso “Sin R”, y R-Wtp4, en el caso “Con R”. “3M” hace referencia a la población 3Mtp5, en el caso “Sin R”, y R-3Mtp4, en el caso “Con R”. “I248T” hace referencia a la población I248Tp4, en el caso “Sin R”, y R-I248Tp4, en el caso “Con R”. “4M” hace referencia a la población 4Mp4, en el caso “Sin R”, y R-4Mp4, en el caso “Con R”.

^b La frecuencia de mutación máxima está expresada como número de mutaciones diferentes encontradas con respecto al número total de nucleótidos secuenciados (apartado 4.17 de Materiales y Métodos).

^c El número de mutaciones por genoma se calcula a partir de la frecuencia de mutación estimando que el genoma de VFA tiene 8300 nucleótidos.

Los valores de frecuencia de mutación de las poblaciones Wtp5, 3Mp5, R-Wtp4, R-3Mp4, I248T y R-I248T son los mismos que se muestran en la Tabla 5.9, y se representan aquí a modo de comparación. Los protocolos de extracción

de RNA viral total así como el método de clonaje del cDNA de cada una de las poblaciones se detallan en los apartados 4.5 y 4.10.2, respectivamente, de Materiales y Métodos.

En presencia de R, al igual que ocurre en R-3Mp4, el número de mutaciones en R-4Mp4 es menor que R-Wtp4, aunque esta diferencia no es significativa ($t = 1,31$ $P > 0,05$). Ambas poblaciones, R-3Mp4 y R-4Mp4, presentan una frecuencia de mutación 1,4 veces menor que R-Wtp4. Por tanto la mutación I248T en 2C dentro del contexto de un virus con la polimerasa 3D(3M), confiere una disminución de la frecuencia de mutación con respecto al virus *wt* en ausencia y presencia de R.

Tabla 5.12 Frecuencia de las transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28-3D(4M).

POBLACIÓN	TRANSICIONES			
	(C→U)+(G→A)		(U→C)+(A→G)	
	% ^a	Frecuencia ^b	% ^a	Frecuencia ^b
Sin R				
4Mp4	14	$0,3 \times 10^{-4}$	86	$1,7 \times 10^{-4}$
Wtp5	22	$1,3 \times 10^{-4}$	78	$4,7 \times 10^{-4}$
3Mp5	27	$0,9 \times 10^{-4}$	55	$2,2 \times 10^{-4}$
I248Tp4	37	$2,2 \times 10^{-4}$	50	$3,0 \times 10^{-4}$
Con R				
R-4Mp4	46	$6,4 \times 10^{-4}$	54	$7,6 \times 10^{-4}$
R-Wtp4	80	15×10^{-4}	20	$3,8 \times 10^{-4}$
R-3Mp4	34	$4,4 \times 10^{-4}$	63	$8,2 \times 10^{-4}$
R-I248Tp4	46	11×10^{-4}	54	13×10^{-4}

^a Frecuencias de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) medidas como porcentaje en el espectro de mutantes de las poblaciones 4Mp4 y R-4Mp4. El porcentaje de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) está expresado con respecto al total de mutaciones (transiciones y transversiones) encontradas en los correspondientes espectros de mutantes. Las frecuencias de transición están basadas en el análisis de los espectros de mutantes estudiados en el apartado 5.3.7. La frecuencia de transiciones de las poblaciones Wtp5, 3Mp5, I248Tp4, R-Wtp4, R-3Mp4 y R-I248Tp4 son los mismos que se muestran en la **Tabla 5.10**, y se representan aquí a modo de comparación.

^b Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) calculado multiplicando el porcentaje de transiciones por la frecuencia de mutación de cada una de las poblaciones indicadas (**Tabla 5.11**).

5.3.7.1 Frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28-3D (4M)

La frecuencia de transiciones (C→U)+(G→A) y (U→C)+(A→G) en el espectro de mutantes de 4Mp4 no es significativamente diferente de R-4Mp4 ($\chi^2 = 1,17$ $P > 0,2$; **Tabla 5.12**),

confirmándose que en este contexto de secuencia el patrón de transiciones se mantiene. En ausencia de droga, la frecuencia de 4Mp4 no es significativamente diferente de Wtp5, 3Mp5 ó I248Tp4 ($\chi^2 = 0$ P>0,5; $\chi^2 = 0,08$ P>0,5 y $\chi^2 = 0,73$ P>0,3, respectivamente; **Tabla 5.12**). En presencia de droga, de nuevo, el espectro de mutantes de la población R-4Mp4 es significativamente diferente que el de R-Wtp4 ($\chi^2 = 13,4$ P<0,001). Se confirma por lo tanto, que estas mutaciones favorecen un patrón de transiciones balanceado.

5.4 Caracterización bioquímica de la actividad NTPasa de 2C de VFA

Dado que durante los pases de pMT28-3D(3M) en presencia de R, se origina un único cambio que codifica la sustitución I248T en 2C, resultaba de máximo interés estudiar las características bioquímicas de este mutante. Además, la sustitución I248T previamente se ha descrito en poblaciones de VFA sometidas a distintas presiones ambientales. Esta sustitución confiere resistencia al tratamiento con GuH en cultivos celulares (Pariente et al., 2003). Aparece durante la adaptación de VFA al cobaya (Nuñez et al., 2001). Además, también se ha descrito su presencia en la secuencia consenso de VFA en infecciones de ratones C57BL/6 por pMT28 (Sanz-Ramos et al., 2008).

La proteína 2C de los picornavirus está implicada en múltiples funciones a lo largo del ciclo infeccioso (apartado 2.7 de Introducción). Por ello, resulta de máximo interés profundizar en el papel biológico de 2C de VFA y del mutante 2C(I248T) mediante caracterización bioquímica. Para ello hemos purificado de 2C *wt* y 2C(I248T) clonadas y expresadas en *E.coli*.

5.4.1 Clonaje, expresión, purificación e identificación de 2C de VFA

La 2C de VFA se clona en el vector pET-28a y se expresa en *E.coli* BL21 como se detalla en los apartados 4.19 y 4.22 de Materiales y Métodos. Este plásmido codifica para 2C fusionada en su extremo N-terminal a 19 aminoácidos entre los que hay un tramo de 6 Histidinas. El plásmido se denomina pET28a-2C (apartado 4.19 de Materiales y Métodos). La enzima se purifica a partir de extractos de *E. coli* mediante columnas de afinidad (Ni-NTA) que reconocen el péptido de 6 His fusionado al extremo N-terminal de 2C.

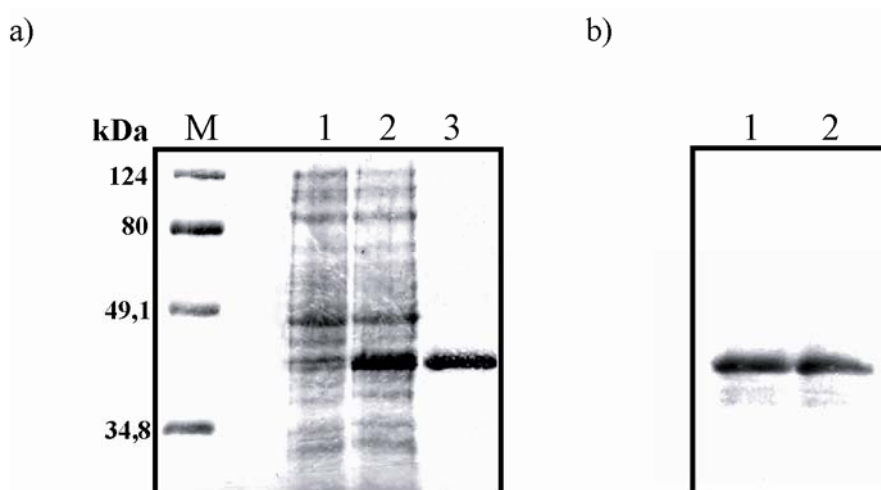


Figura 5.22 Purificación de 2C recombinante de VFA. a) Análisis por SDS-PAGE de 2C recombinante expresada en *E.coli*. En el carril 3 se muestra la proteína 2C purificada mediante cromatografía de afinidad por Ni-NTA. Los carriles 1 y 2 muestran extractos celulares de bacterias *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido pET28a-2C sin inducir (carril 1) o inducidas durante 3 h mediante 1 mM IPTG (carril 2). “M”, carril con marcadores de masa molecular de proteínas. b) Análisis por *western blot* de la proteína recombinante 2C (1) y 2C(I248T) (2) de VFA

utilizando una dilución 1/5000 del anticuerpo monoclonal 1c8. El procedimiento para la purificación de 2C se detalla en el apartado 4.22 de Materiales y Métodos. El protocolo de *western blot* se detalla en el apartado 4.29.

La proteína recombinante presenta una pureza superior al 95% por análisis en gel de SDS-PAGE (**Figura 5.22**). La masa molecular aparente de la proteína purificada es de 35-45 KDa, concordante con La masa molecular esperada de 38 kDa [**Figura 5.22(a)**]. Se ha confirmado la identidad de la proteína 2C mediante *western blot* [**Figura 5.22(b)**]. El anticuerpo monoclonal anti-2C (1c8) empleado ha sido proporcionado por la Dra. Emiliana Brocchi (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia), en forma de líquido ascítico.

5.4.2 Determinación de la actividad ATPasa y GTPasa de 2C de VFA

La proteína 2C de otros picornavirus muestra actividades ATPasa y GTPasa y tiene capacidad de unión al RNA en ensayos *in vitro* (apartado 2.7 de Introducción). La proteína 2C de VFA obtenida durante esta Tesis Doctoral presenta también actividad ATPasa y GTPasa, determinada mediante la detección de ADP o GDP a partir de la fosforólisis de ATP o GTP (Materiales y Métodos 4.28).

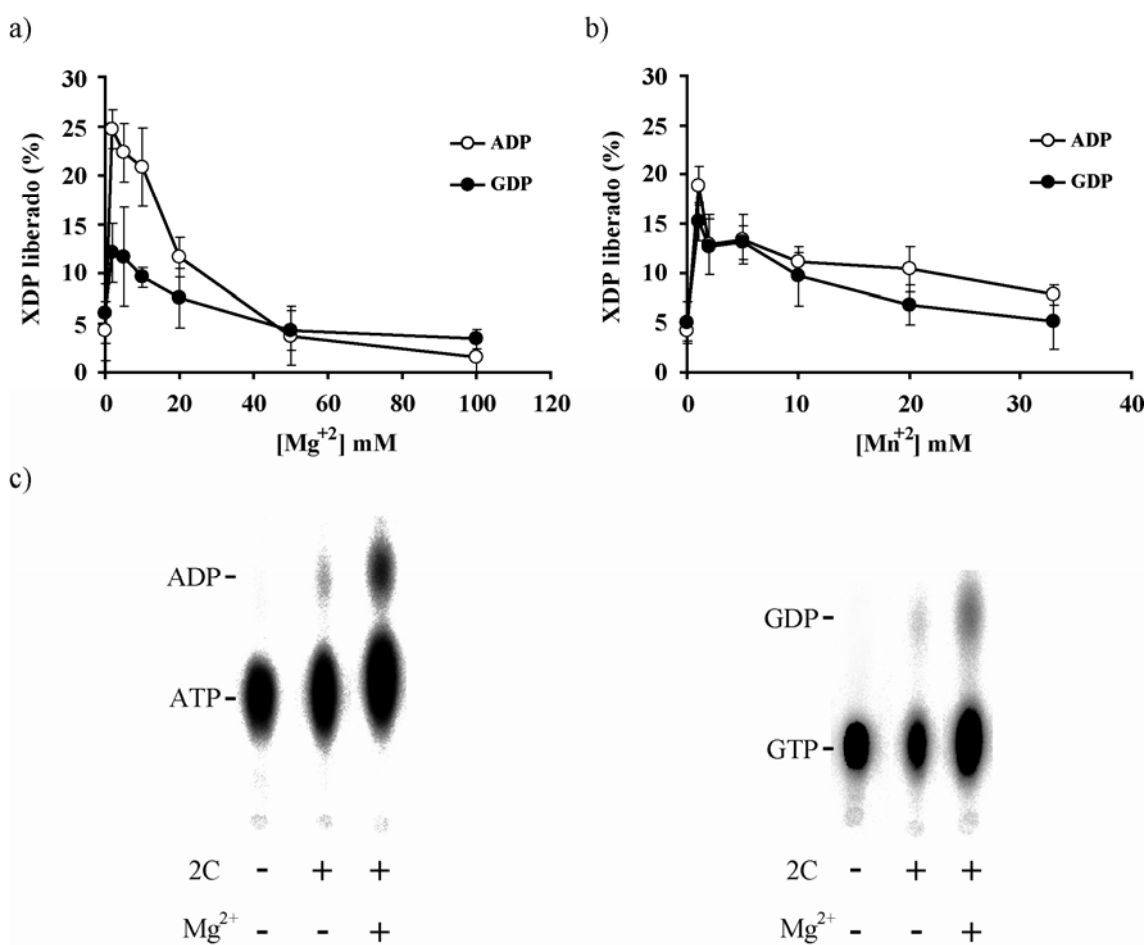


Figura 5.23 Efecto de la concentración de Mg^{2+} y Mn^{2+} en la actividad ATPasa y GTPasa de 2C de VFA. Efecto de la concentración de iones magnesio **a)** o manganeso **b)** en la actividad ATPasa y GTPasa de 2C. El ensayo y el análisis de los productos por cromatografía en capa fina se realizan de manera idéntica al ensayo estándar descrito en Materiales y Métodos (apartado 4.28) con ATP ó GTP 100 μ M durante 30 minutos variando la concentración de cloruro de magnesio o cloruro de manganeso en el ensayo. Los valores son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes; se dan las desviaciones estándar. Se representa el porcentaje de ADP o GDP (representado como “XDP”) liberado en función de la concentración de ATP o GTP utilizada. **c)** Se muestra el resultado de la cromatografía en capa fina de un ensayo de actividad ATPasa y GTPasa en presencia de 2C y Mg^{2+} .

Se han determinado las condiciones óptimas de pH y concentración de NaCl para los ensayos de actividad ATPasa y GTPasa. En ambos casos, la actividad máxima se alcanza a pH entre 7,5 y 8,0 y concentraciones de NaCl entre 5 mM y 20 mM. La temperatura óptima del ensayo se encuentra en el rango comprendido entre 35 y 40°C y la concentración óptima de catión divalente es 2 mM empleando Mg^{2+} y 1 mM empleando Mn^{2+} . La actividad enzimática en presencia de Mg^{2+} es superior a la obtenida con Mn^{2+} (**Figura 5.23**). Por ello se utiliza Mg^{2+} para el resto de experimentos. La actividad ATPasa específica de 2C de VFA (100 μ M ATP como sustrato) es 293 ± 33 nmoles ADP liberado/min x μ g de enzima. La actividad GTPasa específica (100 μ M GTP como sustrato) es 176 ± 4 nmoles GDP liberado/min x μ g de enzima.

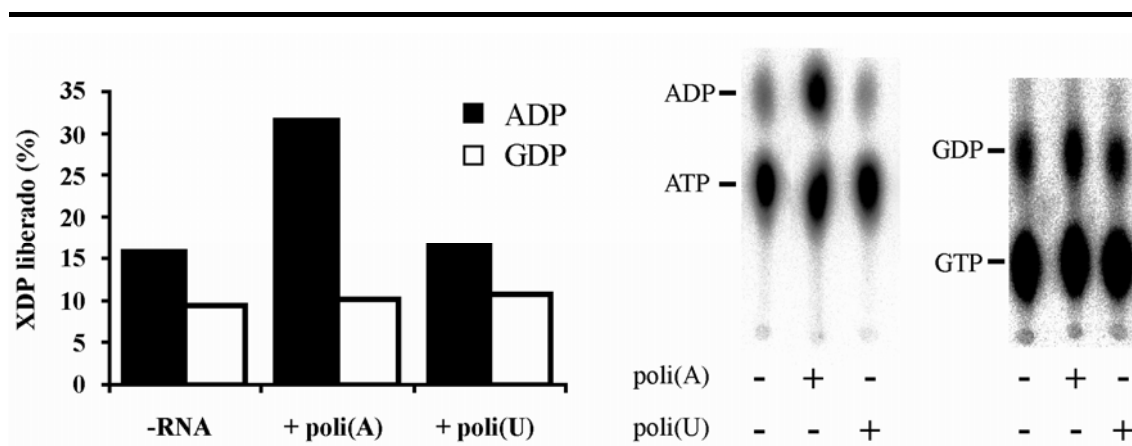


Figura 5.24 Actividad ATPasa y GTPasa de 2C en presencia y ausencia de RNAs homopoliméricos. Actividades relativas ATPasa y GTPasa relativa de 2C de VFA en ensayos realizados tal y como se describe en el apartado 4.28 de Materiales y Métodos. En negro se muestra el porcentaje de ADP liberado durante 30 minutos respecto a la cantidad de ATP inicial en el ensayo (100 μ M) en ausencia o presencia de poli(A) (120ng/ μ l), o poli(U) (120ng/ μ l). En blanco se muestra el porcentaje de GDP liberado durante 30 minutos respecto a la cantidad de GTP total en el ensayo (100 μ M) en ausencia o presencia de poli(A) (120ng/ μ l), o poli(U) (120ng/ μ l). A la derecha se muestra el resultado de la cromatografía de un ensayo de actividad representativo. Los valores representados son la media de 2 experimentos independientes.

5.4.3 Efecto del RNA en la actividad ATPasa y GTPasa de 2C

La actividad NTPasa es estimulada de manera general en presencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla (Kadare & Haenni, 1997). Estudios realizados anteriormente con 2C de poliovirus (PV) han demostrado que la adición de poli(A) en el ensayo de actividad aumentaba 2 veces la actividad ATPasa (Rodríguez y Carrasco, 1993). Estudios posteriores realizados con 2C recombinante de echovirus-9 (E9) (Klein et al., 1999, Samuilova et al., 2006) y PV (Pfister & Wimmer, 1999) demostraron que RNAs de diversa naturaleza son capaces de inhibir la actividad NTPasa.

Por ello, se ha determinado el efecto que ejerce la presencia de poli(A) ó poli(U) en la actividad ATPasa y GTPasa de 2C. Se observa que la adición de poli(A) estimula la actividad ATPasa 2 veces (32% de ADP liberado en presencia de poli(A) respecto a 16% en ausencia; **Figura 5.24**). Sin embargo, la actividad GTPasa no se estimula por poli(A). La adición de poli(U) no estimula ni la actividad ATPasa ni GTPasa de 2C (**Figura 5.24**). Por tanto, la interacción entre el RNA poli(A) y 2C de VFA estimula su actividad ATPasa.

5.4.4 Determinación de las constantes cinéticas $K_{d,app}$ y k_{pol} para el ensayo de actividad ATPasa de las enzima 2C *wt* y 2C(I248T)

Se han determinado las constantes cinéticas $K_{d,app}$ y k_{pol} (afinidad y eficiencia catalítica, respectivamente) de la actividad ATPasa de las enzimas 2C y 2C(I248T) tanto en ausencia como en presencia de poli(A) o poli(U) (**Figura 5.25**). Con ellas se han determinado las eficacias catalíticas (K_{cat}) de ambas enzimas ($k_{pol}/K_{d,app}$) (**Tabla 5.13**).

K_{cat} de 2C *wt* es $1,8 \times 10^{-5} \mu M^{-1} s^{-1}$ ($K_{d,app}$ y k_{pol} de $112 \pm 17 \mu M$ y $0,0020 \pm 0,0001 s^{-1}$, respectivamente). En presencia de poli(A), el valor de $K_{d,app}$ disminuye levemente ($88 \pm 12 \mu M$) mientras que se incrementa sustancialmente k_{pol} ($0,0090 \pm 0,0004 s^{-1}$), aumentando así 5 veces la eficacia catalítica respecto al ensayo en ausencia de RNA. ($K_{cat} = 10 \times 10^{-5} \mu M^{-1} s^{-1}$). En presencia de poli(U) aumentan tanto $K_{d,app}$ como k_{pol} ($223 \pm 40 \mu M$ y $0,0030 \pm 0,0002 s^{-1}$, respectivamente) con respecto a la ausencia de RNA, por lo que la eficacia catalítica no aumenta respecto a la ausencia de RNA ($1,3 \times 10^{-5} \mu M^{-1} s^{-1}$). Estos datos están de acuerdo con los mostrados en el apartado 5.4.3 e indican que poli(A), pero no poli(U), estimula la actividad ATPasa de 2C.

Estos mismos experimentos se realizan con la proteína 2C(I248T). En ausencia de RNA, 2C(I248T) presenta valores de $K_{d,app}$ y k_{pol} de $19 \pm 3 \mu M$ y $0,00020 \pm 0,00006 s^{-1}$, respectivamente (**Tabla 5.13**). Esto indica que la afinidad por ATP es 5 veces superior que la de 2C *wt*, aunque la velocidad máxima de la reacción es 10 veces menor. La eficacia catalítica de 2C(I248T) es $0,8 \times 10^{-5} \mu M^{-1} s^{-1}$, un valor 2 veces inferior al de la enzima *wt*. En presencia de poli(A) tanto $K_{d,app}$ como k_{pol} aumentan considerablemente ($82 \pm 12 \mu M$ y $0,004 \pm 0,0002 s^{-1}$, respectivamente) lo que resulta en un aumento de 5 veces en la eficacia catalítica ($K_{cat} = 5 \times 10^{-5} \mu M^{-1} s^{-1}$). Este valor es, de nuevo, 2 veces inferior al de la enzima *wt*. Sin embargo, el dato más significativo es que 2C(I248T), a diferencia de 2C *wt*, es fuertemente estimulada por poli(U). En presencia de poli(U), el valor de $K_{d,app}$ ($16 \pm 3 \mu M$) se mantiene constante mientras

que el valor de k_{pol} aumenta 20 veces ($0,0030 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$) con respecto a la ausencia de RNA. Por tanto, la eficacia catalítica aumenta 15 veces ($19 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$). En definitiva, la eficacia catalítica ATPasa de 2C *wt* es 2 veces superior a 2C(I248T) tanto en ausencia como en presencia de poli(A), mientras que la eficacia catalítica de 2C(I248T) es 15 veces la de 2C *wt* en presencia de poli(U). Este dato sugiere que el cambio I248T afecta fuertemente a las propiedades bioquímicas de 2C.

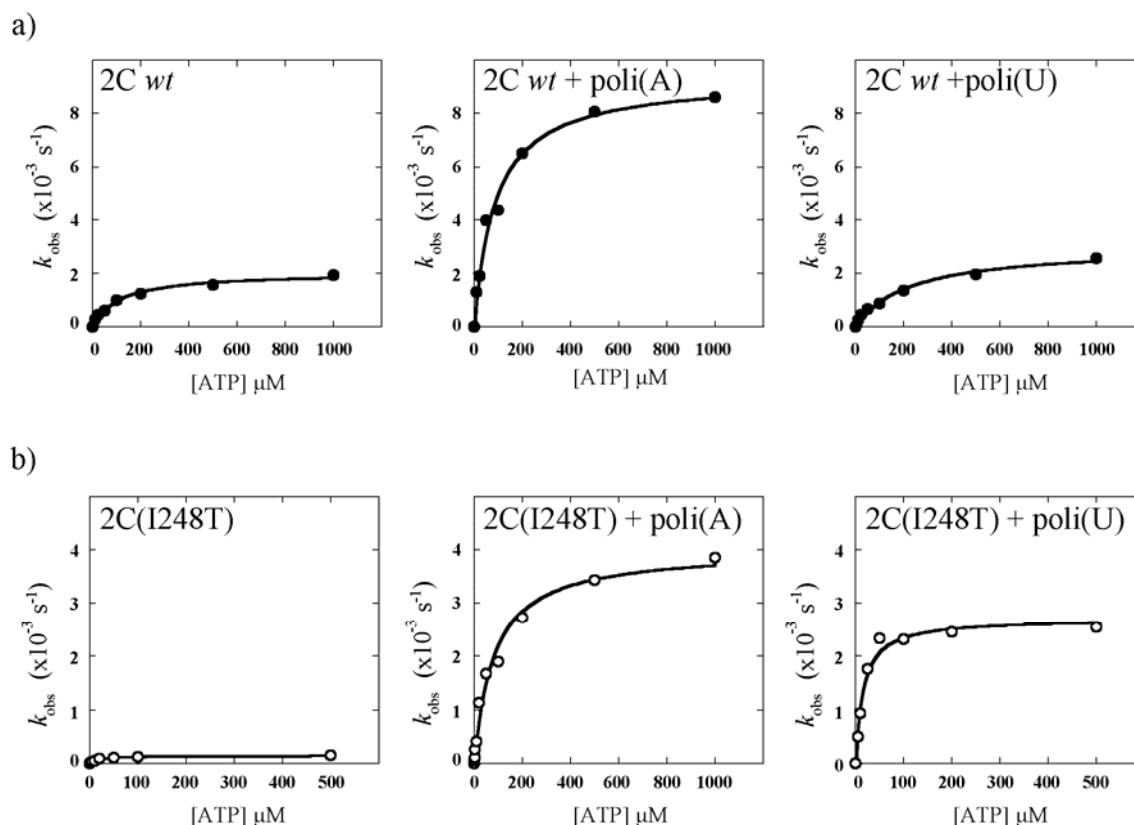


Figura 5.25 Determinación de parámetros cinéticos $K_{d,\text{app}}$ y k_{pol} de 2C y 2C(I248T) para el ensayo de actividad ATPasa. **a)** Representación de la velocidad de reacción (k_{obs}) en función de concentraciones crecientes de ATP con 2C *wt* en ausencia o presencia de poli(A) (120ng/μl) ó poli(U) (120ng/μl). Los datos experimentales se ajustan a una hipérbola en cada caso. **b)** Igual que en a) utilizando 2C(I248T); obsérvese las diferencias en las escalas de abscisas y ordenadas entre a) y b). Los procedimientos para la realización de los ensayos de actividad ATPasa con 2C se detallan en el apartado 4.28 de Materiales y Métodos. La representación gráfica así como la obtención de la ecuación de las distintas hipérbolas se realiza con el programa *KaleidaGraph* (Synergy Software).

Tabla 5.13 Valores de las constantes cinéticas de 2C y 2C(I248T) para el ensayo de actividad ATPasa.

ENZIMA	$K_{d,app}$ (μM)	k_{pol} (s^{-1})	$k_{pol}/K_{d,app}$ ($\mu\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)
2C wt	112 \pm 17	0,0020 \pm 0,0001	1,8 x 10 ⁻⁵
2C wt + poli(A)	88 \pm 12	0,0090 \pm 0,0004	10 x 10 ⁻⁵
2C wt + poli(U)	223 \pm 40	0,0030 \pm 0,0002	1,3 x 10 ⁻⁵
2C(I248T)	19 \pm 3	0,0002 \pm 0,0001	0,8 x 10 ⁻⁵
2C(I248T) + poli(A)	82 \pm 12	0,0040 \pm 0,0002	5 x 10 ⁻⁵
2C(I248T) + poli(U)	16 \pm 3	0,0030 \pm 0,0001	19 x 10 ⁻⁵

Valores de $K_{d,app}$ y k_{pol} del ensayo de ATPasa en ausencia de RNA, o presencia de poli(A) o poli(U) para las enzimas 2C wt y 2C(I248T) obtenidos a partir del análisis de las gráficas que se muestran en la **Figura 5.25**. Se muestra el valor de eficacia catalítica (K_{cat}) calculado como $k_{pol}/K_{d,app}$.

5.4.5 Determinación de las constantes cinéticas $K_{d,app}$ y k_{pol} para el ensayo de actividad GTPasa de las enzima 2C wt y 2C(I248T)

Al igual que para la actividad ATPasa, se determinaron también los parámetros cinéticos $K_{d,app}$ y k_{pol} de las enzimas 2C wt y 2C(I248T) para el ensayo de actividad GTPasa (**Figura 5.26**).

En ausencia de RNA, la eficacia catalítica es 1,1 x 10⁻⁵ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (**Tabla 5.14**). Este valor es 2 veces inferior al valor obtenido en actividad ATPasa en ausencia de RNA (comparar **Tabla 5.14** con **Tabla 5.13**). En presencia tanto de poli(A) como de poli(U), los valores de $K_{d,app}$ y k_{pol} aumentan, aunque la eficacia catalítica en ambos casos es 0,9 x 10⁻⁵ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Estos datos están de acuerdo con los mostrados en el apartado 5.4.2 e indican que la eficacia catalítica de 2C wt para el ensayo de actividad GTPasa no está influida por la adición de RNA aunque sí modifica los parámetros $K_{d,app}$ y k_{pol} .

En el caso de 2C(I248T), la eficacia catalítica de actividad GTPasa es 0,6 x 10⁻⁵ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (**Tabla 5.14**), 2 veces inferior que en 2C wt. En presencia de poli(A), los valores de $K_{d,app}$ y k_{pol} aumentan, al igual que ocurre con 2C wt en estas condiciones, aunque la eficacia catalítica en presencia de RNA (0,4 x 10⁻⁵ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) no varía significativamente. Sin embargo, en presencia de poli(U), al igual que ocurre en el ensayo de actividad ATPasa, el valor de eficacia catalítica aumenta 20 veces (11 x 10⁻⁵ $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) con respecto a la ausencia de RNA. Este aumento se debe tanto a la disminución de $K_{d,app}$, como al aumento de k_{pol} (**Tabla 5.14**). En definitiva, la eficacia catalítica (ATPasa y GTPasa) de 2C wt es 2 veces superior a la de 2C(I248T) tanto en ausencia como en presencia de poli(A). Sin embargo, la eficacia catalítica en presencia de poli(U) es 11 veces superior en 2C(I248T) que en 2C wt.

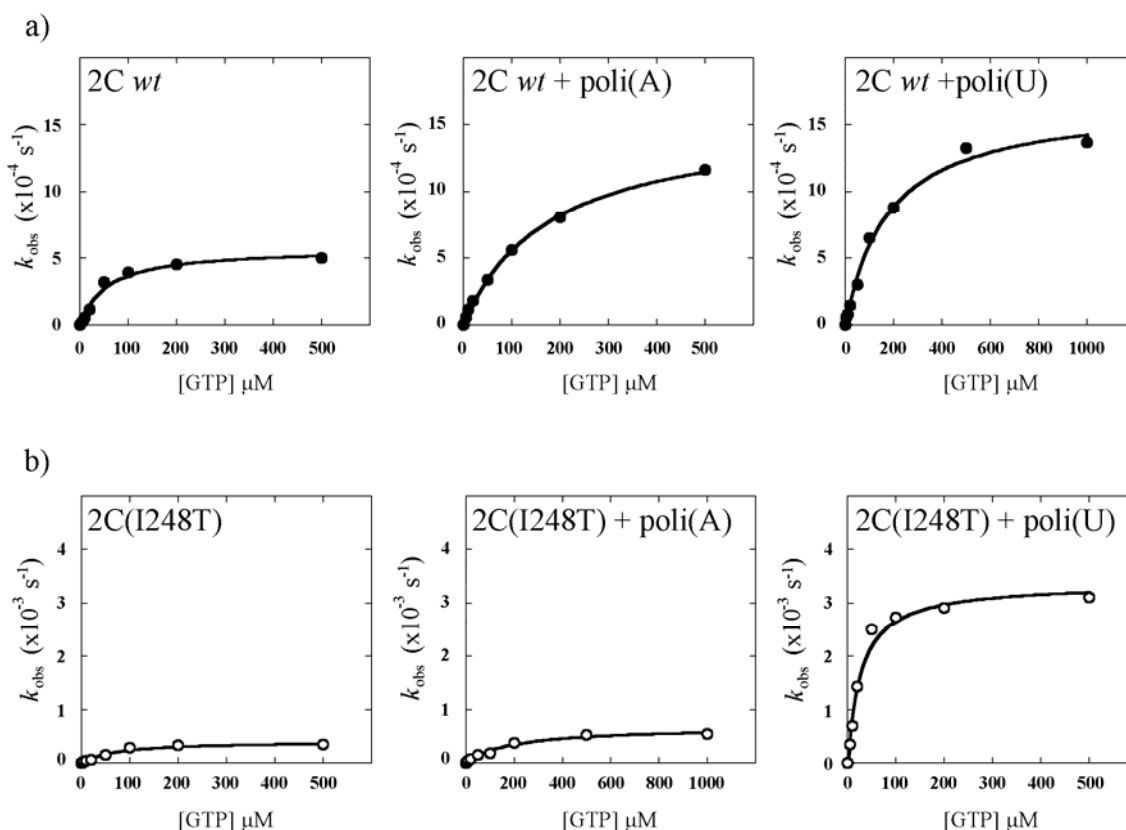


Figura 5.26 Determinación de los parámetros cinéticos $K_{d,app}$ y k_{pol} para 2C *wt* y 2C(I248T) en el ensayo de actividad GTPasa. **a)** Representación de los valores k_{obs} en función de concentraciones crecientes de GTP obtenidos con 2C *wt* en ausencia de RNA o en presencia de poli(A) (120ng/μl) o poli(U) (120ng/μl). Los datos k_{obs} se ajustan a una hipérbola en cada caso. **b)** Igual que en a) utilizando 2C(I248T); obsérvese las diferencias en las escalas de abscisas y ordenadas entre a) y b). Los procedimientos de la realización de los ensayos de actividad GTPasa con 2C se detallan en el apartado 4.28 de Materiales y Métodos. La representación gráfica así como la obtención de la ecuación de las distintas hipérbolas se realiza con el programa *KaleidaGraph* (Synergy Software).

Tabla 5.14 Valores de las constantes cinéticas de 2C y 2C(I248T) para el ensayo de actividad GTPasa.

ENZIMA	$K_{d,app}$ (μM)	k_{pol} (s ⁻¹)	$k_{pol}/K_{d,app}$ (μM ⁻¹ x s ⁻¹)
2C <i>wt</i>	56±12	0,0006±0,0000	1,1 x 10 ⁻⁵
2C <i>wt</i> + poli(A)	176±12	0,0020±0,0001	0,9 x 10 ⁻⁵
2C <i>wt</i> + poli(U)	176±23	0,0020±0,0001	0,9 x 10 ⁻⁵
2C(I248T)	70±14	0,0004±0,0000	0,6 x 10 ⁻⁵
2C(I248T) + poli(A)	191±36	0,0007±0,0001	0,4 x 10 ⁻⁵
2C(I248T) + poli(U)	27±3	0,0030±0,0002	11 x 10 ⁻⁵

Valores de $K_{d,app}$ y k_{pol} para la actividad GTPasa en ausencia de RNA o presencia de poli(A) o poli(U) de las enzimas 2C y 2C(I248T) obtenidos a partir del análisis de las gráficas que se muestran en la **Figura 5.26**. Se muestra el valor de eficacia catalítica (K_{cat}) calculado como $k_{pol}/K_{d,app}$.

5.4.6 Determinación de las constantes cinéticas $K_{d,app}$ y k_{pol} para el ensayo de actividad ATPasa de las enzima 2C y 2C(I248T) en presencia de Mn^{2+}

El ensayo estándar de actividad ATPasa y GTPasa (descritos en el apartado 5.4.2) se realiza en presencia de Mg^{2+} (apartado 4.28 de Materiales y Métodos). Para determinar si el cambio I248T influye activamente en la unión al metal durante la fosforólisis, se ha estudiado la actividad ATPasa en presencia de Mn^{2+} y poli(A). La eficacia catalítica de 2C bajo estas condiciones es 2 veces superior a la de 2C(I248T) ($7,6 \times 10^{-5} \mu M^{-1} s^{-1}$ y $3,5 \times 10^{-5} \mu M^{-1} s^{-1}$, respectivamente; **Figura 5.27**). Estos valores son menores, tanto para 2C como para 2C(I248T), que los obtenidos para el mismo ensayo en presencia de Mg^{2+} y poli(A) (ver **Tabla 5.13**) pero se mantiene la misma relación entre ellos [la eficacia catalítica ATPasa de 2C *wt* en presencia de poli(A) es 2 veces la de 2C(I248T), tanto en presencia de Mg^{2+} como de Mn^{2+}]. Así, la sustitución I248T no parece estar influyendo directamente en la interacción de 2C con el ion divalente.

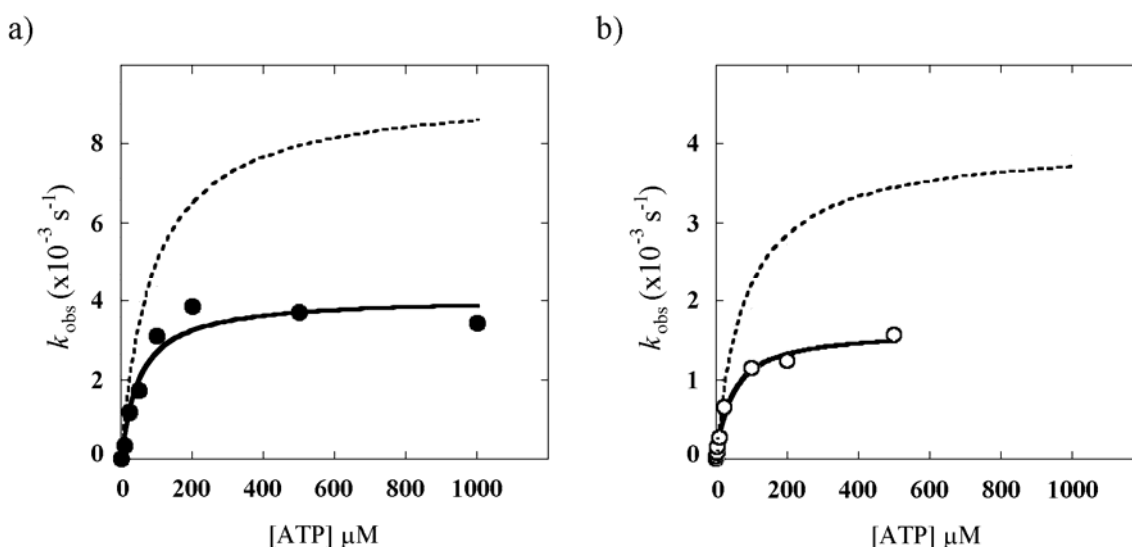


Figura 5.27 Determinación de los parámetros cinéticos $K_{d,app}$ y k_{pol} para el ensayo de actividad ATPasa de 2C en presencia de poli(A) utilizando Mn^{2+} como metal. **a)** Representación de los valores de k_{obs} en función de concentraciones crecientes de ATP obtenidos con 2C *wt* en presencia de poli(A) (120ng/ μ l) y 1 mM Mn^{2+} . Los datos experimentales se ajustan a una hipérbola en cada caso. La línea discontinua representa, a modo de comparación, la hipérbola obtenida con 2C *wt* en presencia de poli(A) (120ng/ μ l) y Mg^{2+} mostrados en la **Figura 5.25**. **b)** Igual que en a) utilizando 2C(I248T); obsérvese la diferencia en la escala de ordenadas entre a) y b). Los procedimientos para la realización de los ensayos de actividad ATPasa con 2C se detallan en el apartado 4.28 de Materiales y Métodos. La representación gráfica así como la obtención de la ecuación de las distintas hipérbolas se realiza con el programa *KaleidaGraph* (Synergy Software).

5.4.7 Inhibición de la actividad ATPasa de 2C y 2C(I248T) por ribavirina-5'-trifosfato

La ribavirina-5'-trifosfato (RTP) se puede incorporar durante la síntesis de RNA viral por la polimerasa de VFA como análogo de ATP o GTP (apartado 2.8.2.2.5 de Introducción). Dado que 2C tiene actividad ATPasa y GTPasa, y que la mutación I248T en 2C aparece durante tratamiento con R de pMT28-3D(3M), resultaba interesante investigar si RTP ejerce algún efecto inhibitorio en la actividad NTPasa de 2C y 2C(I248T).

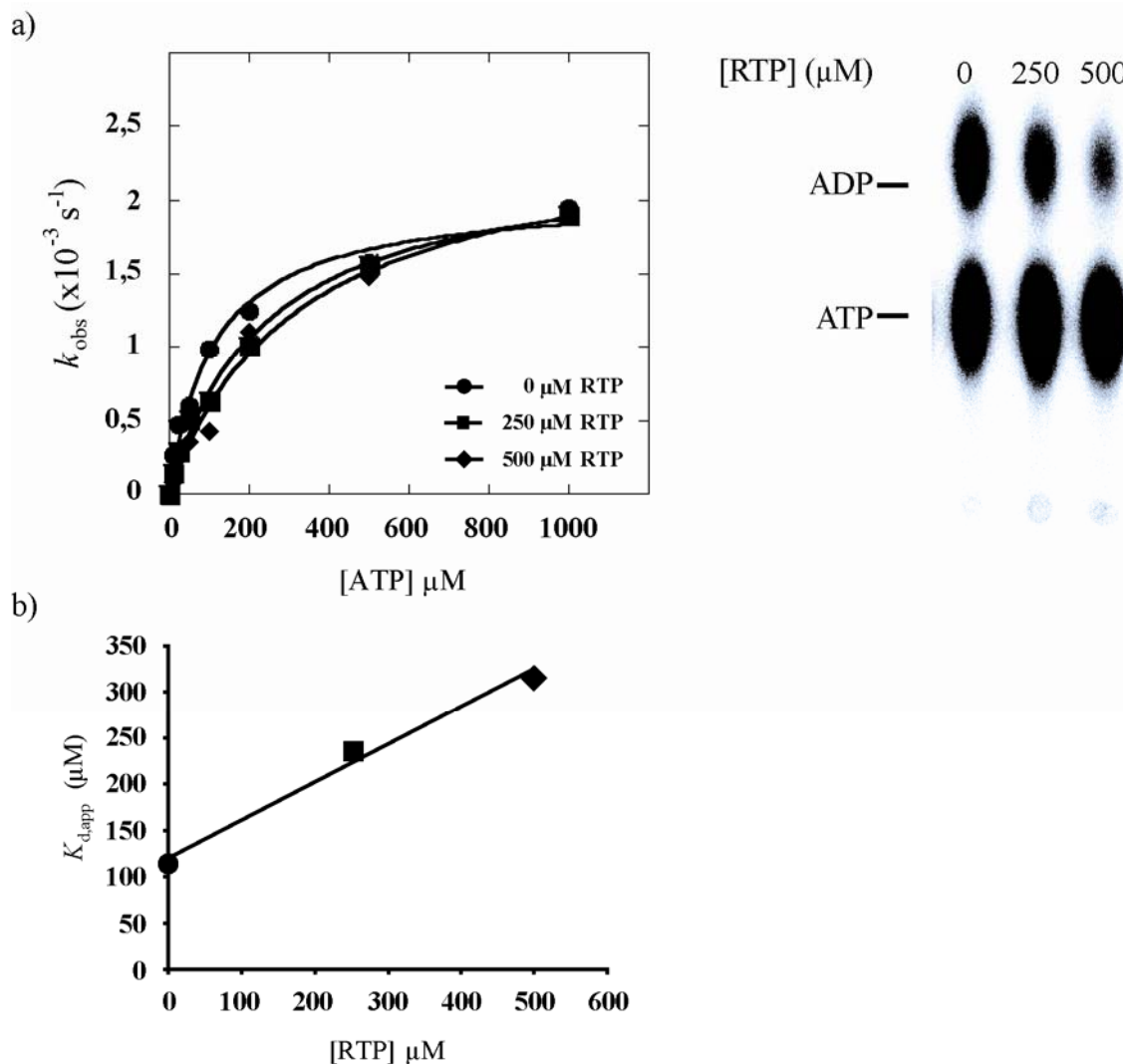


Figura 5.28 Determinación de los parámetros cinéticos de inhibición de 2C *wt* por RTP. a) Representación de los valores de k_{obs} en función de concentraciones crecientes de ATP en ausencia ó en presencia de 250 μM ó 500 μM RTP. Los datos se ajustan a una hipérbola. Los procedimientos para calcular la actividad ATPasa de 2C *wt* se detallan en el apartado 4.28 de Materiales y Métodos. La representación gráfica así como la obtención de la ecuación de las distintas hipérbolas se realiza con el programa *KaleidaGraph* (*Synergy Software*). A la derecha se muestra el resultado de la cromatografía de un ensayo de actividad ATPasa en presencia de 0, 250 y 500 μM RTP. b) Representación de los datos de $K_{d,app}$ obtenidos en a) en función de la concentración de RTP; la pendiente de la recta es $K_{d,app}/K_{i,app} = 273$ μM. Cada una de los puntos representados se basa en al menos 3 conjuntos de datos independientes.

Para ello se han realizado ensayos de actividad ATPasa tal y como se describe en el apartado 4.28 de Materiales y métodos en presencia de 0, 250 y 500 μM RTP [Figura 5.28(a)]. Los valores de $K_{d,app}$ para 2C *wt* en ausencia y presencia de 250 y 500 μM RTP son 112 ± 17 , 237 ± 30 y 317 ± 66 μM , respectivamente. Los correspondientes valores de k_{pol} son $0,0020 \pm 0,0001$; $0,0020 \pm 0,0001$ y $0,0020 \pm 0,0002$ s^{-1} , respectivamente, e indican que RTP ejerce una acción inhibitoria sobre la actividad ATPasa. La inhibición es competitiva, ya que los valores de $K_{d,app}$ aumentan mientras que k_{pol} permanece constante. A partir de los datos obtenidos de $K_{d,app}$, se deduce que la $K_{i,app}$ de RTP para la actividad ATPasa de 2C *wt* es 273 μM [Figura 5.28(b)]. Este valor es solamente 2,5 veces superior a $K_{d,app}$ para ATP en el ensayo.

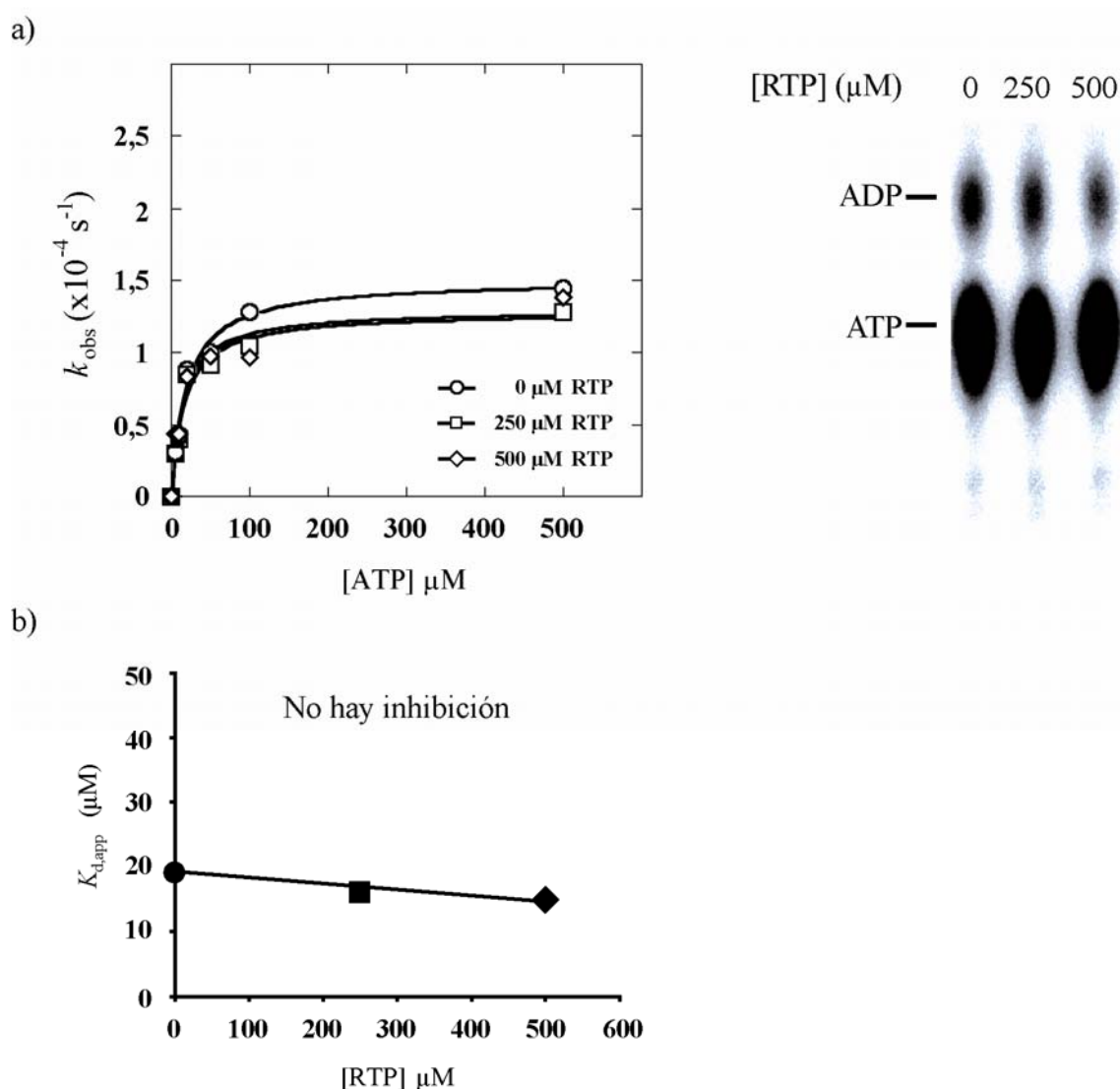


Figura 5.29 Determinación de los parámetros cinéticos de la inhibición de 2C(I248T) por RTP. a) Representación de los valores de k_{obs} para 2C(I248T) en función de concentraciones crecientes de ATP en ausencia ó en presencia de 250 μM ó 500 μM RTP. Los datos experimentales se ajustan a una hipérbola en cada caso. Los procedimientos para calcular la actividad ATPasa con 2C(I248T) se detallan en el apartado 4.28 de Materiales y Métodos. La representación gráfica así como la obtención de la ecuación de las distintas hipérbolas se realiza con el

programa *KaleidaGraph* (Synergy Software). Cada una de las representaciones se basa en al menos 3 conjuntos de datos independientes. A la derecha se muestra el resultado de la cromatografía de un ensayo de actividad ATPasa en presencia de 0, 250 y 500 μM RTP. **b)** Representación de los datos de $K_{d,app}$ obtenidos en a) en función de la concentración de RTP; la recta construida a partir de estos puntos tendría pendiente negativa, por lo que no se puede calcular $K_{i,app}$. Cada uno de los puntos representados se basa en al menos 3 conjuntos de datos independientes.

Los mismos experimentos realizados con 2C(I248T) [Figura 5.29(a)] indican que RTP, en las concentraciones utilizadas, no inhibe la actividad ATPasa. Los valores de $K_{d,app}$ en ausencia y presencia de RTP 250 y 500 μM RTP son 19 ± 3 , 16 ± 4 y 15 ± 4 μM , respectivamente. Los correspondientes valores para k_{pol} son $0,00015 \pm 0,00001$; $0,00013 \pm 0,00001$ y $0,00013 \pm 0,00001$ s^{-1} , respectivamente. Por lo tanto, para 2C(I248T), no se puede deducir ningún valor de $K_{i,app}$ congruente a partir de los datos de $K_{d,app}$ y k_{pol} [Figura 5.29(b)].

5.4.8 Inhibición de la actividad ATPasa de 2C y 2C(I248T) por hidrocloreuro de guanidinio

El hidrocloreuro de guanidinio (GuH) es un potente inhibidor de la replicación de picornavirus (apartado 2.7 de Introducción). Se han descrito mutantes de resistencia a GuH en picornavirus que mapean en la región que codifica la proteína no estructural 2C en varios picornavirus (Baltera & Tershak, 1989, Belsham & Normann, 2008, Klein et al., 2000, Pariente et al., 2003, Pincus et al., 1986, Pincus & Wimmer, 1986, Tolskaya et al., 1994). La inhibición de la actividad ATPasa por GuH en ensayos *in vitro* ha sido documentada por el grupo del Dr. Eckard Wimmer (Pfister & Wimmer, 1999). Sin embargo, GuH no mostró tener efecto inhibitorio en experimentos posteriores realizados con 2C de otros picornavirus (De Palma et al., 2008, Klein et al., 2000). Dado que la sustitución I248T también aparece en poblaciones de VFA que adquieren resistencia a GuH (Pariente et al., 2003), resultaba interesante determinar si GuH inhibe la actividad ATPasa de 2C *wt* y 2C(I248T) en ensayos *in vitro*.

Para ello se han determinado los valores $K_{d,app}$ y k_{pol} de la actividad ATPasa de 2C y 2C(I248T) en ausencia y presencia de 10 y 20 mM GuH (Figura 5.30). En 2C *wt*, $K_{d,app}$ se mantiene constante a concentraciones crecientes de GuH, mientras que k_{pol} disminuye. Por tanto, se concluye de los datos que GuH ejerce una inhibición no competitiva, es decir, GuH se puede unir tanto a 2C *wt* como al complejo 2C-ATP en un sitio diferente del centro activo.

A partir de la recta obtenida de la representación de $K_{d,app}/k_{pol}$ en función de la concentración de GuH, se deduce que $K_{i,app}$ es 10 mM (constante de disociación del inhibidor con la enzima) [Figura 5.30(b)]. Para obtener el valor de $\alpha K_{i,app}$ (constante de disociación del inhibidor con el complejo 2C-ATP) se representan los valores de $1/k_{pol}$ para cada concentración de GuH utilizada, en función de la concentración del inhibidor [Figura 5.30(c)]; el valor obtenido de αK_i es 8 mM. Por tanto, GuH ejerce una inhibición no competitiva y muestra una afinidad similar tanto por la enzima como por el complejo enzima-sustrato. Estos valores de $K_{i,app}$ y $\alpha K_{i,app}$ están en el mismo rango que la concentración necesaria para inhibir la replicación de VFA en cultivos de células BHK-21 (Pariente et al., 2003).

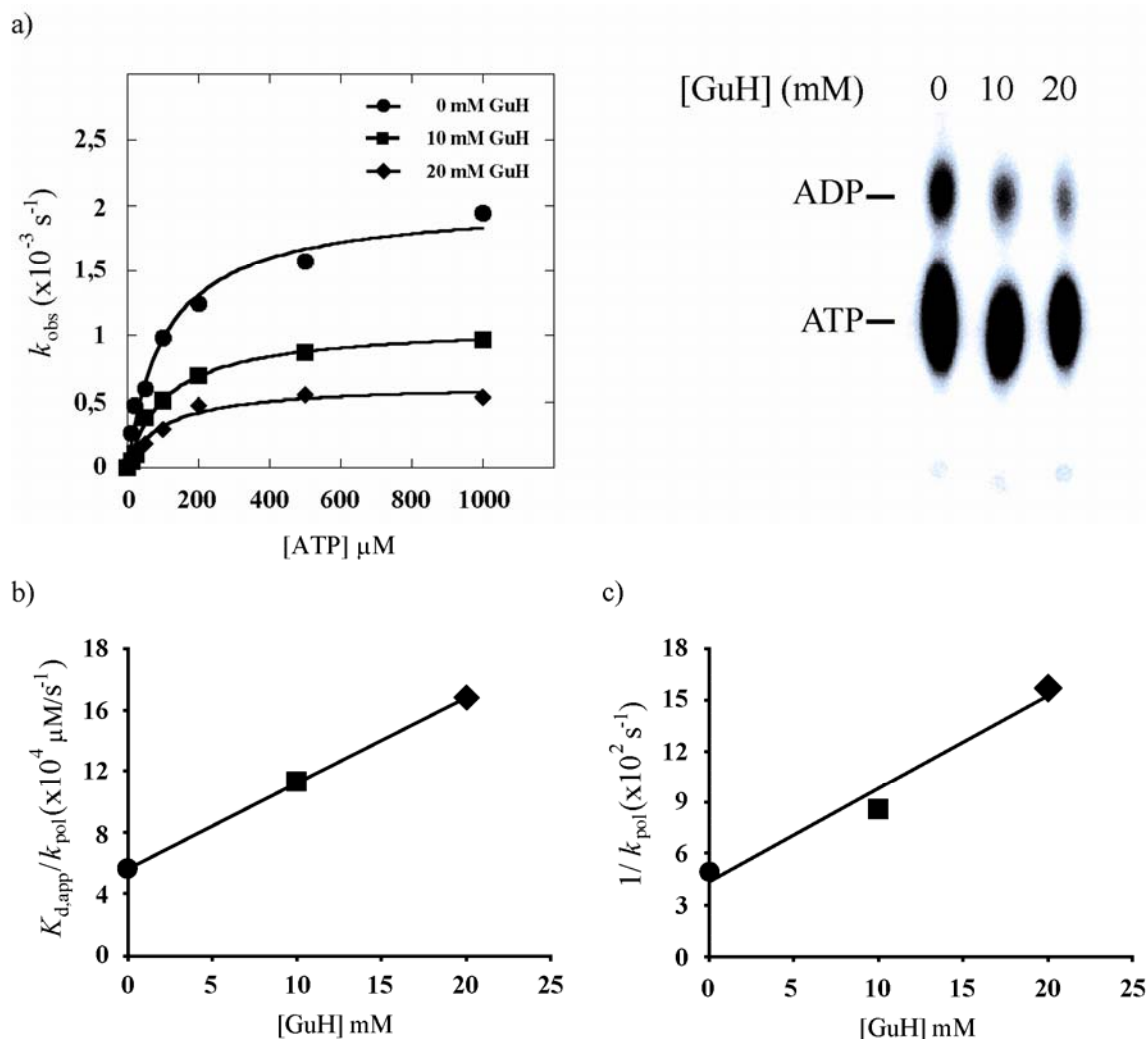


Figura 5.30 Determinación de los parámetros cinéticos de inhibición de 2C *wt* por GuH. **a)** Representación de los valores k_{obs} para 2C *wt* en función de concentraciones crecientes de ATP en ausencia ó en presencia de 10 mM ó 20 mM GuH. Los datos experimentales se ajustan a una hipérbola en cada caso. Los procedimientos para calcular la actividad ATPasa con 2C se detallan en el apartado 4.28 de Materiales y Métodos. La representación gráfica así como la obtención de la ecuación de las distintas hipérbolas se realiza con el programa *KaleidaGraph* (Synergy Software). A la derecha se muestra el resultado de la cromatografía de un ensayo de actividad ATPasa en presencia de 0, 10 y 20 mM GuH. **b)** Representación de $K_{d,app}/k_{pol}$ de cada una de las gráficas obtenidas en a) en función de la concentración de GuH; la pendiente de la recta es $(K_{d,app}/k_{pol})/K_{i,app}$ de donde se deduce que $K_{i,app} = 10$ mM. Cada una de los puntos representados se basa en al menos 3 conjuntos de datos independientes. **c)** Representación de la inversa de los datos de obtenidos de k_{pol} en a) en función de la concentración de GuH, la pendiente de la recta es $K_{d,app}/\alpha K_{i,app}$ de donde se deduce que $\alpha K_{i,app} = 8$ mM. Cada una de los puntos representados se basa en al menos 3 conjuntos de datos independientes.

El mutante 2C(I248T), por el contrario, no muestra cambios en los valores de $K_{d,app}$ y k_{pol} en función de incrementos en la concentración de GuH (10 y 20 mM) [Figura 5.31(a)]. Se ha realizado un ensayo adicional en presencia de 52 mM GuH y $K_{d,app}$ y k_{pol} tampoco se ven afectados, indicando que $K_{i,app}$ y $\alpha K_{i,app}$ para la inhibición de la actividad ATPasa por GuH en 2C(I248T) está por encima de 50 mM. Por tanto, no se puede deducir ningún valor de $K_{i,app}$ congruente a partir de los datos de $K_{d,app}$ o k_{pol} obtenidos [Figura 5.31(a) y (b)]. Estos datos

están de acuerdo con que la mutación I248T otorga resistencia frente a la inhibición con GuH de la actividad ATPasa *in vitro*.

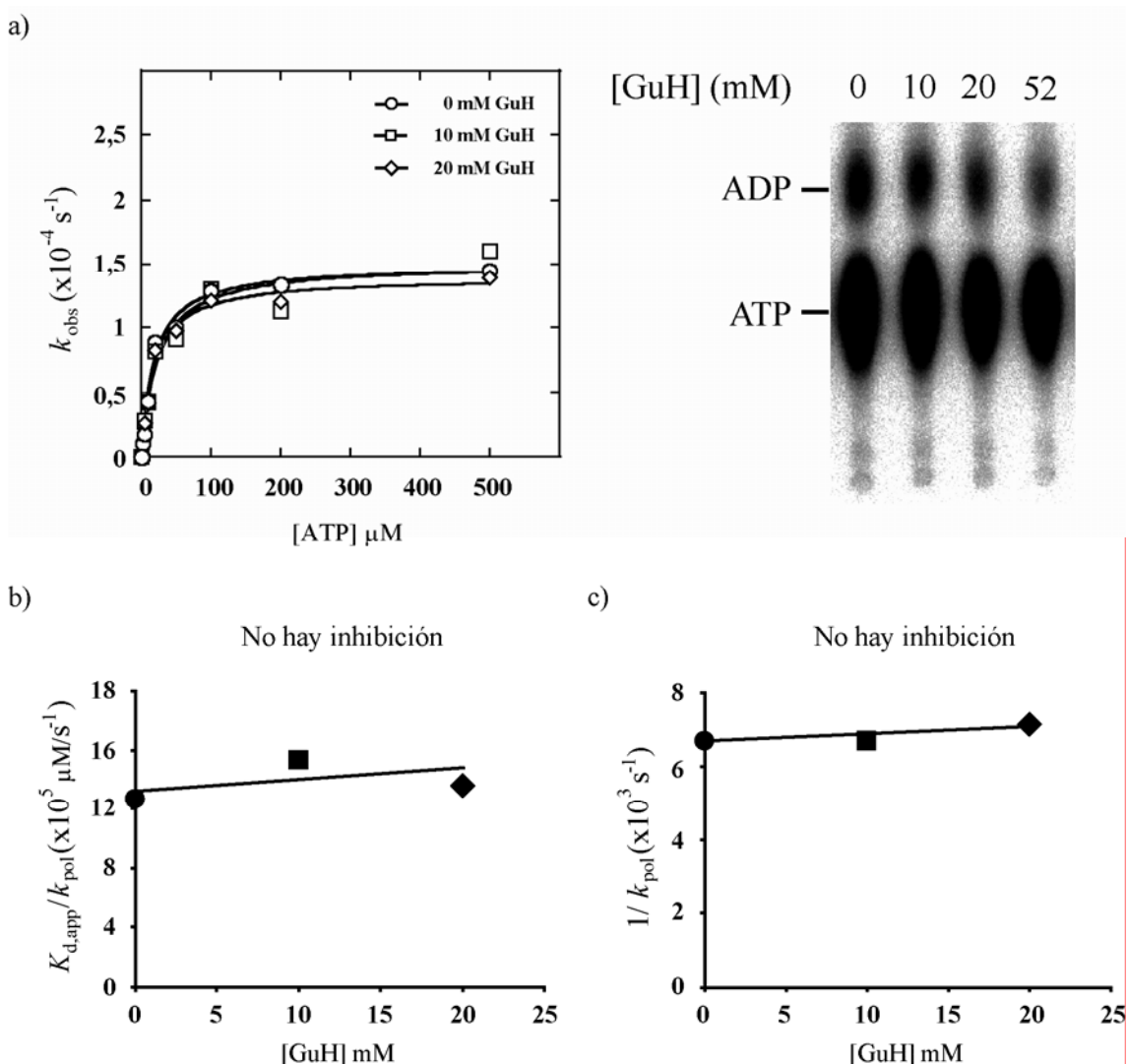


Figura 5.31 Determinación de los parámetros cinéticos de inhibición de 2C(I248T) por GuH. **a)** Representación de los valores de k_{obs} para 2C(I248T) en función de concentraciones crecientes de ATP en ausencia ó en presencia de 10 mM ó 20 mM GuH. Los datos se ajustan a una hipérbola en cada caso. Los procedimientos para calcular la actividad ATPasa con 2C(I248T) se detallan en el apartado 4.28 de Materiales y Métodos. La representación gráfica así como la obtención de la ecuación de las distintas hipérbolas se realiza con el programa *KaleidaGraph* (*Synergy Software*). A la derecha se muestra el resultado de la cromatografía de un ensayo de actividad ATPasa en presencia de 0, 10, 20 y 52 mM GuH. **b)** Representación de $K_{\text{d,app}}/k_{\text{pol}}$ de cada una de las gráficas obtenidas en a) en función de la concentración de GuH. La pendiente de la recta es $(K_{\text{d,app}}/k_{\text{pol}})/K_{\text{i,app}}$. El valor experimental de $K_{\text{i,app}}$ es 296 mM. Cada una de los puntos representados se basa en al menos 3 conjuntos de datos independientes. **c)** Representación de la inversa de los datos obtenidos de k_{pol} en a) en función de la concentración de GuH, la pendiente de la recta es $K_{\text{d,app}}/\alpha K_{\text{i,app}}$. En este caso, el valor de $\alpha K_{\text{i,app}}$ es 277 mM, muy por encima de la concentración de GuH utilizada en el ensayo. Cada una de los puntos representados se basa en al menos 3 conjuntos de datos independientes.

5.5 Caracterización bioquímica y estructural del complejo 3D-VPg implicado en el inicio de la replicación

La uridilación de VPg por 3D es el paso previo requerido para la iniciación de la replicación en picornavirus (apartado 2.5 de Introducción). Una vez uridilado, VPg-UMP actúa como molécula cebadora de la síntesis de RNA viral. En VFA, a diferencia del resto de picornavirus, hay 3 copias de VPg en lugar de 1 (apartado 2.3.2.1 de Introducción).

En colaboración con el grupo de la Dra. Nuria Verdaguer se ha determinado la estructura tridimensional del complejo formado por 3D y VPg-1 (Ferrer-Orta et al., 2006) (**Figura 2.10** de Introducción). A partir de los datos estructurales, se determinaron los aminoácidos conservados de VPg que interaccionan con residuos de 3D, y a su vez los residuos de 3D que interaccionan con VPg (**Figura 5.32** y **Tabla 5.15**).

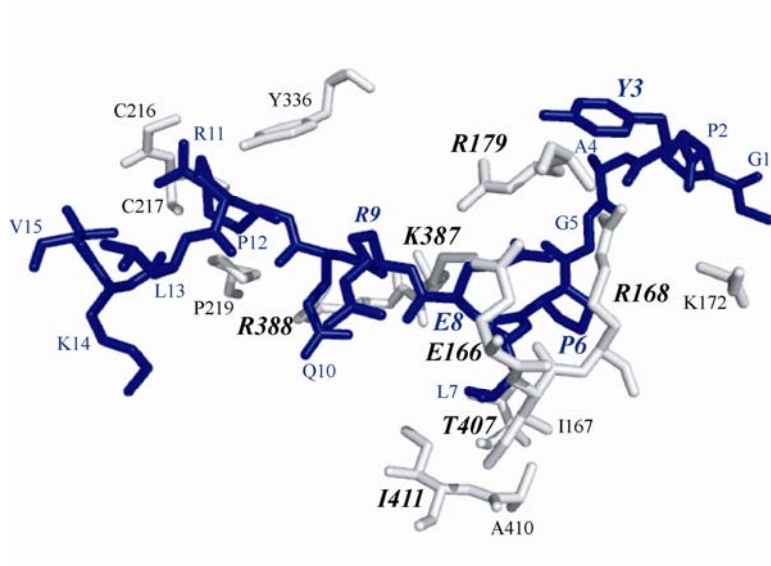


Figura 5.32 Interacciones entre VPg y 3D. Estructura resuelta del péptido VPg-1 de VFA (azul) en presencia de los aminoácidos de 3D (blanco) con los que contacta. Los residuos de 3D se indican en color negro. Se resaltan los aminoácidos que han sido reemplazados en las polimerasas mutantes estudiadas. Los residuos de VPg-1 se indican en color azul. Se resaltan los aminoácidos que han sido reemplazados en las VPgs mutantes estudiadas. La figura se han realizado con el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas [PDB; <http://www.pdb.org>; código 2D7S]. Basado en (Ferrer-Orta et al., 2006).

Para comprobar el efecto de la sustitución de estos aminoácidos en la estabilidad del complejo y, por lo tanto, en la uridilación de VPg por 3D, se realizan ensayos de uridilación de VPg *in vitro* utilizando diversos mutantes de VPg-1 y 3D de VFA (apartado 4.23.3 de Materiales y Métodos). Este estudio se ha realizado en colaboración con el Dr. Armando Arias. Las sustituciones en VPg-1 Y3F, E8A, R9A, R9E y en menor medida, P6A, producen una

reducción significativa en la uridilación de VPg *in vitro* comparada con la actividad obtenida con los péptidos *wt*: VPg-1, VPg-2 y VPg-3 [Figura 5.33(a)].

Tabla 5.15 Aminoácidos de 3D que interaccionan con el péptido VPg.

AMINOÁCIDO
E166, I167, R168
K172, R179 , C216
C217, P219, Y336,
K387, R388, T407
A410, I411

En letra negra se resaltan los residuos que han sido reemplazados en las polimerasas mutantes estudiadas.

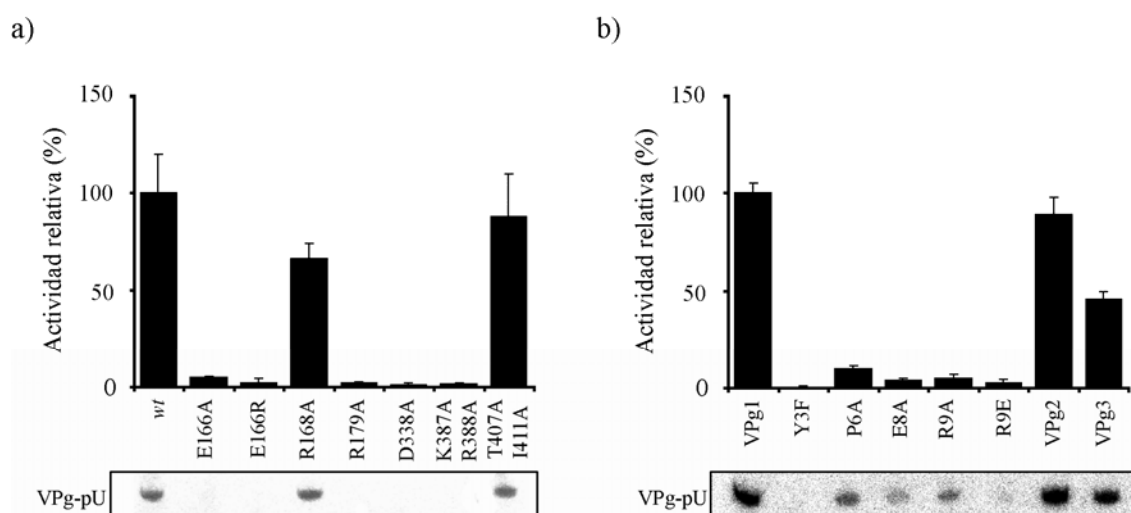


Figura 5.33 Efecto de la sustitución de aminoácidos de 3D y VPg en la uridilación de VPg. **a)** Actividad relativa de la uridilación de VPg por distintos mutantes de 3D con 1 ó 2 sustituciones de aminoácido. La actividad relativa está medida como porcentaje respecto a la actividad específica de 3D *wt* en el ensayo de uridilación de VPg-1 ($0,43 \pm 0,02$ pmol UMP incorporado/min \times μ g de enzima). **b)** Actividad relativa de uridilación de VPg de VPg-1, VPg-2, VPg-3 y VPg-1 con distintas sustituciones de aminoácido. La actividad relativa está medida como porcentaje respecto a la actividad específica de 3D en el ensayo de uridilación de VPg utilizando VPg-1. La secuencia de aminoácidos de las distintas VPgs utilizadas así como el procedimiento del ensayo de uridilación de VPg *in vitro* por 3D se detallan en el apartado 4.23.3.

Por tanto, los residuos de VPg identificados en la estructura cristalina que están implicados en interacciones con 3D, son críticos para una eficiente uridilación por parte de la polimerasa. De la misma manera, los mutantes de la polimerasa E166A, E166R, R179A, D338A y (K387A, R388A) afectan drásticamente a la actividad enzimática, a excepción de los

mutantes R168A y (T407A, I411A), que no presentan pérdida de la actividad *in vitro* [**Figura 5.33(b)**]. Estos datos demuestran que estos residuos alteran la superficie predicha de interacción entre VPg y 3D y son críticos para la uridilación de VPg. Resultados no publicados de la Dra. Cristina Escarmís muestran que clones infecciosos que contienen las mutaciones antes indicadas en 3D son inviables a excepción de R168A y (T407A, I411A), que muestran una replicación disminuida. El inicio de la replicación viral es un paso crítico en la viabilidad viral. Estrategias antivirales que inhiban este proceso son de gran interés para nuestro grupo.

5.6 Caracterización molecular de la actividad antiviral de 5-fluorouridina-5'-trifosfato para el virus de la fiebre aftosa

5.6.1 Inhibición de la replicación de VFA por 5-fluorouracilo

Anteriormente en nuestro laboratorio, se ha descrito que 5-fluorouracilo (FU) produce una pérdida en la infectividad viral, y en algunos casos, la extinción de VFA en cultivos celulares asociada a un aumento en la complejidad del espectro de mutantes (Pariente et al., 2003, Pariente et al., 2005, Pariente et al., 2001, Sierra et al., 2000). Experimentos adicionales han demostrado que FU inhibe la replicación viral de VFA (Pariente et al., 2003), sugiriendo que tenía un efecto tanto mutagénico como inhibitorio.

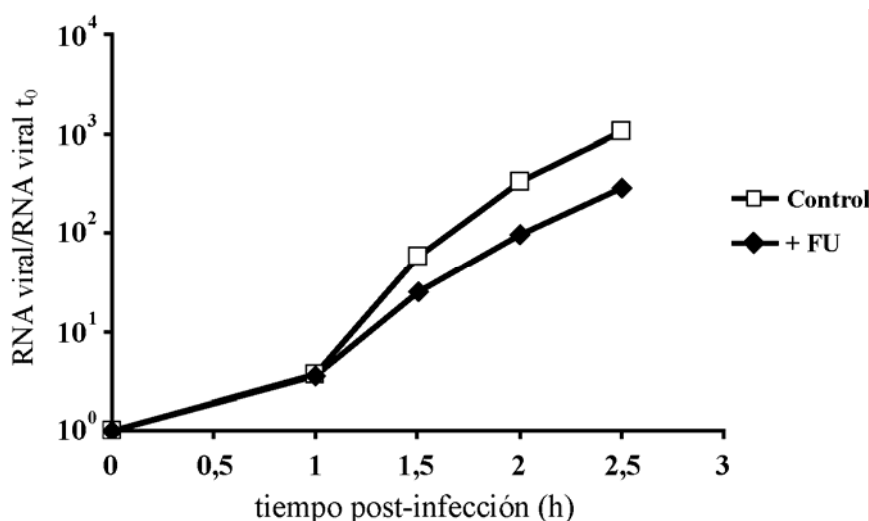


Figura 5.34 Cinética de RNA viral intracelular en presencia y ausencia de FU. Se infectan células BHK-21 a una m.d.i. de 0,5 UFPs/célula en presencia o ausencia de 200 µg/ml FU con virus producido a partir de pMT28. Se realiza una infección independiente para cada uno de los puntos recogidos. El procedimiento para infecciones en medio líquido, extracción del RNA viral intracelular y cuantificación del mismo se describen en los apartados 4.4.1, 4.4.2, 4.5.2 y 4.9, respectivamente, de Materiales y Métodos.

Para comprobar la actividad inhibitoria de FU durante la replicación de VFA, se ha realizado una cinética de síntesis de RNA viral intracelular en presencia y ausencia de 200 µg/ml de FU (**Figura 5.34**). En presencia de FU, la síntesis de RNA presenta un retraso con respecto a la replicación en ausencia de la droga, confirmando que FU inhibe la replicación viral. Esta inhibición de la síntesis de RNA se traduce con una menor producción de proteínas virales (**Figura 5.35**).

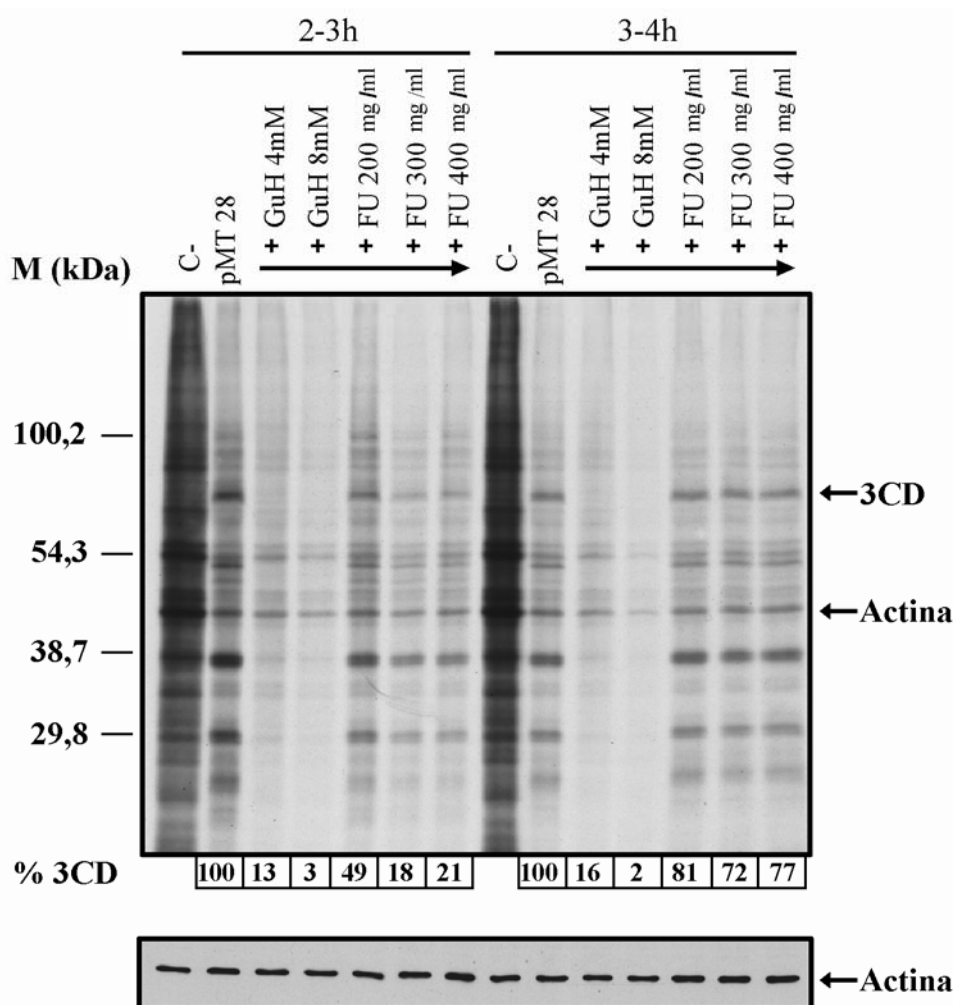
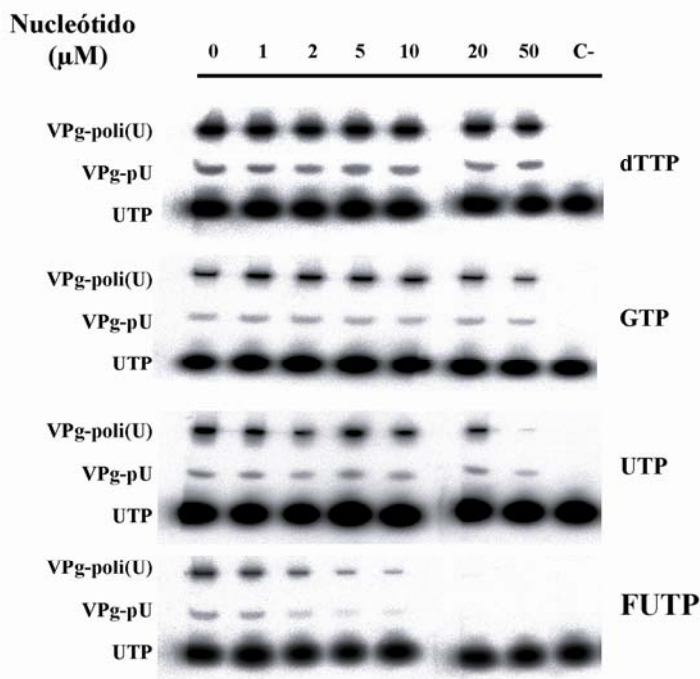


Figura 5.35 Disminución de la síntesis de proteínas virales en infecciones en presencia de FU. Se electroporan células BHK-21 (apartado 4.15.2 de Materiales y Métodos) con RNA transcrito a partir de pMT28 tal y como se describe en el apartado 4.14 de Materiales y Métodos, en ausencia (pMT28) o en presencia de las cantidades indicadas de GuH o de FU. Las células se marcan con [35 S] Met-Cys a tiempos 2-3 h (columnas de la izquierda) o 3-4 h (columnas de la derecha) post-electroporación, tal y como se indica en el apartado 4.16 de Materiales y Métodos. “C-” electroporación en ausencia de pMT28. Debajo de cada carril se muestra el correspondiente porcentaje de proteína 3CD respecto al valor obtenido en ausencia de drogas (columna “pMT28”). Debajo de cada uno de los carriles se muestra la cantidad de actina medida por *western blot* (Materiales y Métodos 4.29) utilizada como control de la cantidad de extracto intracelular utilizado.

Se observa una disminución del precursor proteico 3CD en presencia de FU a 3 h post-electroporación (49, 18 y 21% de cantidad relativa de 3CD en presencia de 200, 300 y 400 μ M FU respectivamente, **Figura 5.35**, columnas de la izquierda). A 4 h se observa que la síntesis de proteínas virales se recupera hasta niveles normales (81%, 71% y 77% de 3CD, **Figura 5.35**, columnas de la derecha). Como control, se ha empleado hidrócloruro de guanidinio (GuH) que es un potente inhibidor de la replicación de VFA (Pariente et al., 2003). El GuH ejerce una actividad inhibitoria a tiempos tempranos y tardíos post-electroporación de acuerdo con resultados anteriores (Perales et al., 2007), (16 y 2% de 3CD sintetizada en presencia de 4 y 8

mM GuH, respectivamente, a las 4 h post-electroporación). Tanto FU como GuH no afectan la parada de la síntesis de proteínas celulares mediada por la proteasa L (**Figura 5.35**, comparar carril “C-” con el resto de carriles), sugiriendo que la reducción observada en los niveles de traducción de proteínas virales en presencia de FU, es debida a una menor replicación del virus. Estos resultados son consistentes con un efecto inhibitorio de FU en las etapas iniciales de la replicación de VFA.

a)



b)

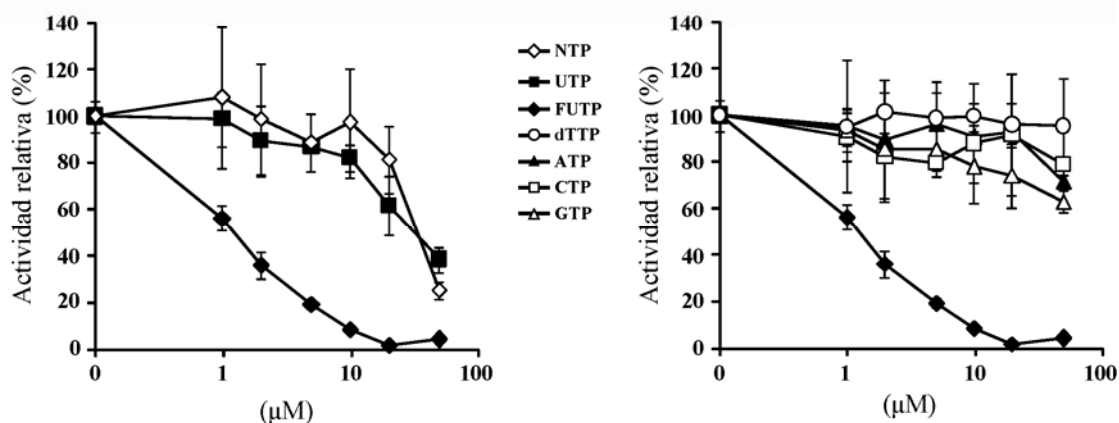


Figura 5.36 Inhibición de la uridilación de VPg por FUTP. Se realiza un ensayo de uridilación de VPg, como se indica en el apartado 4.23.3 de Materiales y Métodos en presencia de concentraciones crecientes de dTTP, ATP, CTP, GTP, UTP, FUTP o de una mezcla equimolar de los 4 nucleótidos estándar (denominado “NTP”). **a)** Análisis electroforéticos representativos de ensayos de uridilación de VPg con dTTP, GTP, UTP y FUTP (concentraciones crecientes de 0-50 μM , indicado en la parte superior de la figura. “C-” indica un ensayo realizado sin enzima). **b)** Actividad relativa medida como porcentaje de VPg uridilada en función de la cantidad de nucleótido que se muestra

en a). Los resultados fueron obtenidos a partir de al menos 3 experimentos independientes. Se muestran las desviaciones estándar.

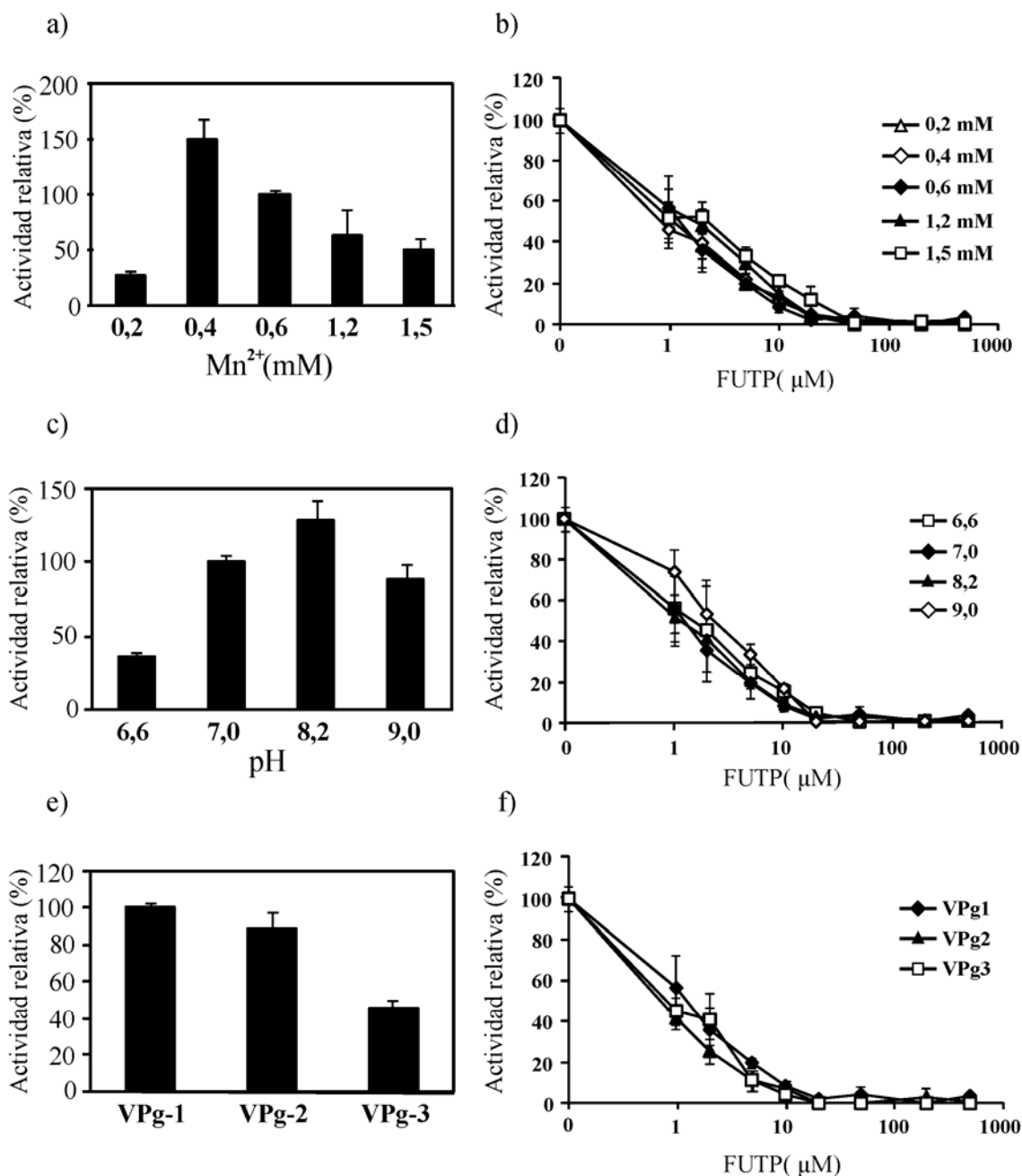
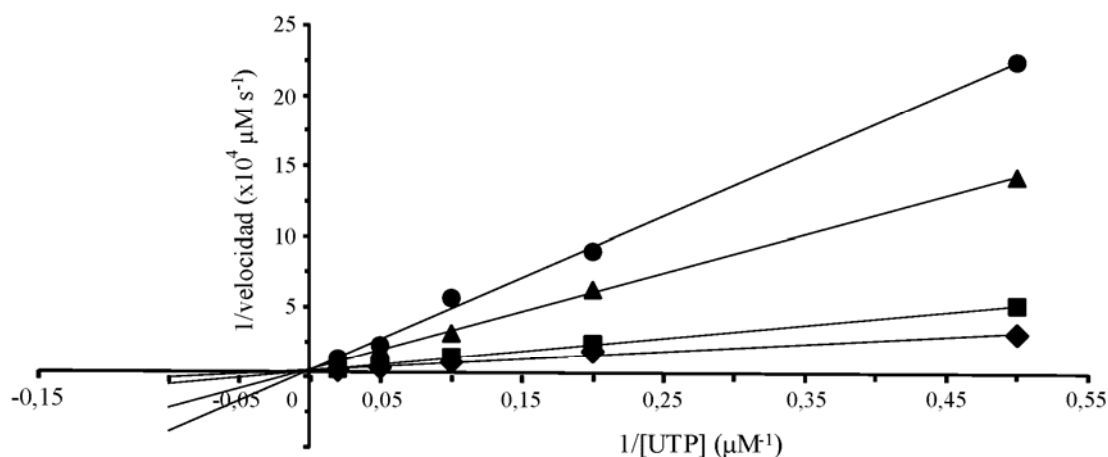


Figura 5.37 Efecto de la concentración de Mn^{2+} , pH y secuencia de VPg en la reacción de uridilación y en la inhibición por FUTP. Se han llevado a cabo experimentos de uridilación de VPg tal como se indica en el apartado 4.23.3 de Materiales y Métodos. **a)** Actividad de uridilación de VPg en las concentraciones indicadas de Mn^{2+} , relativas a la actividad con 0,6 mM Mn^{2+} . **b)** Inhibición por FUTP de la actividad de uridilación de VPg relativa a diferentes concentraciones de Mn^{2+} . **c)** Actividad de uridilación a diferente pH, relativa a la actividad pH 7,0. **d)** Inhibición por FUTP de la actividad de uridilación de VPg relativa medida a diferentes pHs. **e)** Uridilación relativa de las 3 isoformas de VPg de VFA (VPg-1, VPg-2, VPg-3) respecto a VPg-1. **f)** Inhibición de la uridilación de las 3 isoformas de VPg por FUTP. Las secuencias de las distintas VPgs están en la **Figura 4.4** de Materiales y Métodos.

a)



b)

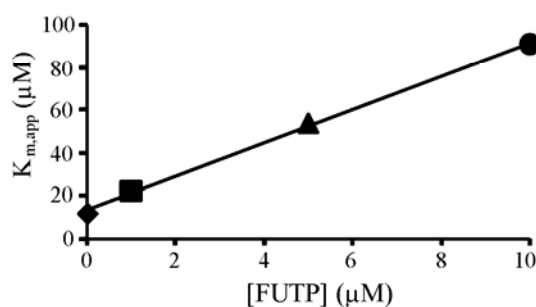


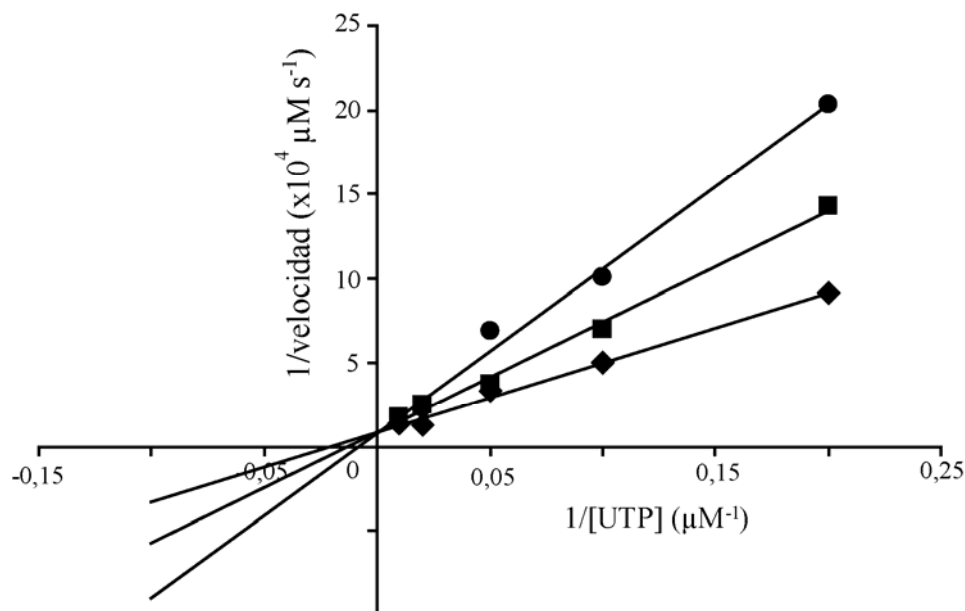
Figura 5.38 Determinación de los parámetros cinéticos de la inhibición de la uridilación de VPg por FUTP. a) Representación de Lineweaver-Burk de la uridilación de VPg por 3D en ausencia (♦) o en presencia de 1 μM (■), 5 μM (▲) y 10 μM (●) FUTP. Se muestra la media de dos conjuntos de datos. b) representación gráfica de los valores de $K_{m,\text{app}}$ obtenidos a partir del análisis de la gráfica descrita en a), en función de la concentración de FUTP. La pendiente de esta gráfica es $K_{m,\text{app}}/K_{i,\text{app}} = 7,8$. A partir de este valor se determina el valor de $K_{i,\text{app}}$ ($1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$). La reacción de uridilación de VPg y la cuantificación de los productos uridilados se realiza según se describe en el apartado 4.23.3 de Materiales y Métodos.

5.6.2 Inhibición de la uridilación de VPg por FUTP

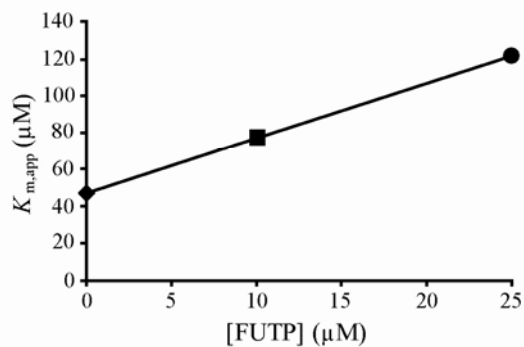
Dado que la uridilación de VPg es el paso clave anterior a la replicación (apartado 5.5, y apartado 2.5 de Introducción), nos preguntamos si FUTP (análogo de UTP) podría inhibir la replicación viral porque afectase la uridilación de VPg. Para investigarlo, se han realizado experimentos uridilación de VPg *in vitro* en presencia de concentraciones crecientes de FUTP. Los resultados (**Figura 5.36**) indican que FUTP es un fuerte inhibidor de la uridilación de VPg ($\text{IC}_{50} = 1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$), mientras que la inhibición observada con otros nucleótidos ensayados es muy inferior ($\text{IC}_{50} \geq 42 \pm 9 \mu\text{M}$), incluyendo UTP, cuya inhibición aparente es debida a la dilución isotópica.

Para caracterizar el efecto de la concentración de Mn^{2+} , pH y secuencia de la VPg utilizada en el ensayo, se realizan varios experimentos según se detalla en el apartado 4.22.3 de Materiales y Métodos. Se observa que la inhibición es similar al modificar las variables estudiadas (**Figura 5.37**).

a)



b)



c)

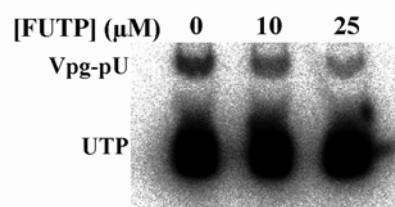


Figura 5.39 Determinación de los parámetros cinéticos de la uridilación de VPg por FUTP. a) Representación de Lineweaver-Burk de la uridilación de VPg por 3D en ausencia (♦) o en presencia de 10 μM (■), y 25 μM (●) FUTP. Se representa la media de dos conjuntos de datos. b) representación gráfica de los valores de $K_{m,app}$ obtenidos a partir de la gráfica a) en función de la concentración de FUTP. La pendiente de esta gráfica es $K_{m,app}/K_i^{app} = 3,0$. A partir de este valor se determina el valor de K_i^{app} ($16 \pm 5 \mu M$). c) Se muestra el análisis electroforético de uridilación de VPg en presencia de *cre* y 3CD, y de 0, 10 y 25 μM FUTP. La reacción de uridilación de VPg y la cuantificación de los productos uridilados se realizó según se describe en el apartado 4.23.3.1 de Materiales y Métodos.

5.6.3 Determinación del tipo de inhibición causado por FUTP en el ensayo de uridilación de VPg *in vitro*

Se ha determinado la cinética de inhibición de la uridilación de VPg *in vitro*, utilizando concentraciones crecientes de FUTP (0, 1, 5, 10 μM). Con los datos obtenidos se realiza una representación gráfica de dobles recíprocos, o de Lineweaver-Burk [Figura 5.38(a)], a partir de la cual se concluye que la inhibición ejercida por FUTP es de tipo competitiva.

En ausencia de FUTP, el valor de $K_{m,app}$ para UTP es $17 \pm 4 \mu\text{M}$ para la uridilación de VPg *in vitro*. A partir de los valores de $K_{m,app}$ obtenidos de la gráfica de Lineweaver-Burk se representa el valor de $K_{m,app}$ en función de la concentración de FUTP [Figura 5.38(b)]. A partir de la pendiente de la recta obtenida se determina la $K_{i,app}$ de FUTP, cuyo valor es $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Este valor indica que FUTP tiene una afinidad unas 10 veces mayor que el UTP por el complejo de iniciación de la replicación. Por tanto, el FUTP es un fuerte inhibidor competitivo de la uridilación de VPg *in vitro*.

5.6.4 Inhibición de la uridilación de VPg por FUTP en condiciones fisiológicas

En los experimentos anteriores se produce la uridilación de VPg utilizando RNA poli(A) como molde y Mn^{2+} como catión. Sin embargo, los datos experimentales de otros grupos (Nayak et al., 2005, Paul et al., 2003, van Ooij et al., 2006) sugieren que en condiciones fisiológicas la uridilación de VPg requiere la presencia del elemento *cre* y del precursor proteico 3CD (apartado 2.5 de Introducción), en presencia de Mg^{2+} . Para determinar si FUTP inhibe la uridilación de VPg en condiciones fisiológicas, hemos sintetizado RNA *cre* y expresado y purificado la proteína 3CD de VFA (Agudo et al., 2008).

Se realizan los mismos ensayos cinéticos de inhibición utilizando concentraciones crecientes de FUTP (0, 10 y 25 μM) [Figura 5.39(a)]. Con los datos obtenidos se determinan las constantes cinéticas $K_{m,app}$ y $K_{i,app}$ tal y como se detalla en el apartado anterior. Los valores obtenidos son 47 ± 11 y $16 \pm 5 \mu\text{M}$, respectivamente [Figura 5.39(b)]. En estas condiciones FUTP sigue siendo un fuerte inhibidor para la uridilación de VPg (VPg tiene una afinidad por FUTP 3 veces superior que por UTP), indicando que la actividad inhibitoria de FUTP es independiente del catión divalente empleado en la reacción.

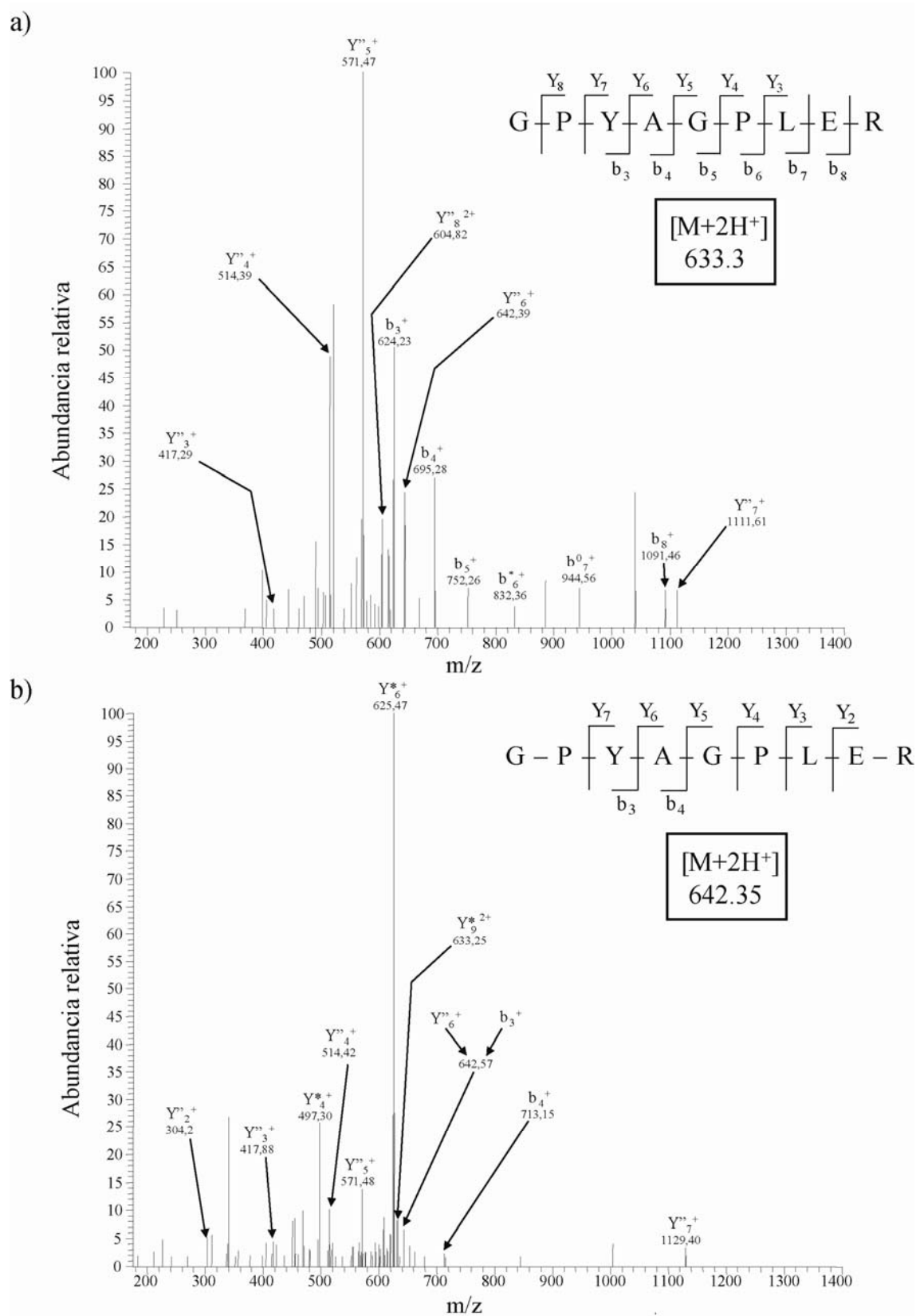


Figura 5.40 Identificación del péptido “GPYAGPLER” unido covalentemente a FUMP. a) Abundancia relativa y valores (m/z) de los productos de fragmentación del péptido uridilado sometido a LC-ESI-IT MS/MS. La masa del péptido uridilado se muestra encuadrada. La nomenclatura de los distintos fragmentos se asigna de acuerdo con la

nomenclatura descrita en (Roepstorff & Fohlman, 1984). **b)** mismo análisis que en a) pero utilizando el péptido fluorouridilado. La masa del péptido fluorouridilado se muestra encuadrada.

5.6.5 Detección del complejo VPg-FUMP por espectrometría de masas

La inhibición de tipo competitivo indica que tanto el UTP como el FUTP compiten por el sitio de uridilación (Ferrer-Orta et al., 2006, Paul, 2002). Esta inhibición podría deberse a la incorporación de FUMP en el residuo Tyr-3 de VPg en lugar de UMP. Si fuese así, se formaría VPg-fluorouridilada. Para determinar si esto ocurre se analiza por espectrometría de masas (MALDI-TOF) (en colaboración con la Dra. A. Marina del Servicio de Proteómica del C.B.M “Severo Ochoa”) el producto de digestión con tripsina de VPg obtenida tras un ensayo de uridilación utilizando 50 μ M de UTP o FUTP como sustrato. A partir de la muestra uridilada se obtiene un péptido con $(m/z) = 633,3$ [M+2H]⁺ Da, correspondiente a un péptido de secuencia “GPYAGPLER” (959,49 Da) que contiene covalentemente unido un residuo UMP (306,2 Da). A partir de la muestra sometida a fluorouridilación, se obtiene un péptido con $(m/z) = 642,35$ [M+2H]⁺ Da, correspondiente al mismo péptido “GPYAGPLER” unido covalentemente a FUMP (324,2 Da). Ambos productos de digestión fueron sometidos a LC-ESI-IT MS/MS. En la muestra fluorouridilada se observan varios productos peptídicos ionizados con un incremento de masa que corresponde a una molécula de FUMP unido covalentemente a la Tyr-3 del péptido analizado, en contraste con la masa de productos ionizados que contienen un UMP unido a la Tyr-3 (como por ejemplo los péptidos b_4^+ e Y''_7^+ , **Figura 5.40**). Estos resultados demuestran que 3D cataliza la unión covalente de FUMP a Tyr-3 de VPg, produciéndose VPg-fluorouridilada.

5.6.6 FUMP se incorpora por la 3D de VFA durante la síntesis *in vitro* de RNA

Los datos previamente publicados en ensayos realizados en cultivos celulares demuestran que FU es mutagénico para VFA (Pariante et al., 2003, Sierra et al., 2000). Para abordar las bases moleculares del carácter mutagénico de FU en cultivos, se ha estudiado el comportamiento de FUTP en ensayos *in vitro* con 3D. En colaboración con el Dr. Armando Arias, se han realizado ensayos de incorporación de FUMP en moldes sym/sub (apartado 4.24 y 4.26 de Materiales y Métodos).

Se ha estudiado la incorporación de nucleótidos frente a U, G, C o A en la posición +1 respecto al extremo 3' del iniciador. El FUMP sólo se incorpora eficientemente frente a A (**Figura 5.41**). La incorporación frente a U, G o C fue indetectable (al menos 16 veces menor que frente a A). La cantidad de FUMP incorporada en posición +1 es comparable a la incorporación de UMP utilizando el mismo molde-iniciador ($25 \pm 2\%$ y $24 \pm 2\%$ de iniciador extendido, respectivamente).

Para investigar si la incorporación de FUMP bloquea la posterior elongación del RNA sintetizado, actuando como terminador de cadena, se ha estudiado la incorporación de nucleótidos tras la incorporación de FUMP en la posición +1 del iniciador. La incorporación de AMP en posición +2 (sym/sub AUGC) tras la incorporación previa de UMP o FUMP es similar

($26 \pm 2\%$ y $24 \pm 4\%$ de iniciador elongado respectivamente) (**Figura 5.42**). Por tanto, FUMP no es un terminador de la síntesis de RNA tras su incorporación.

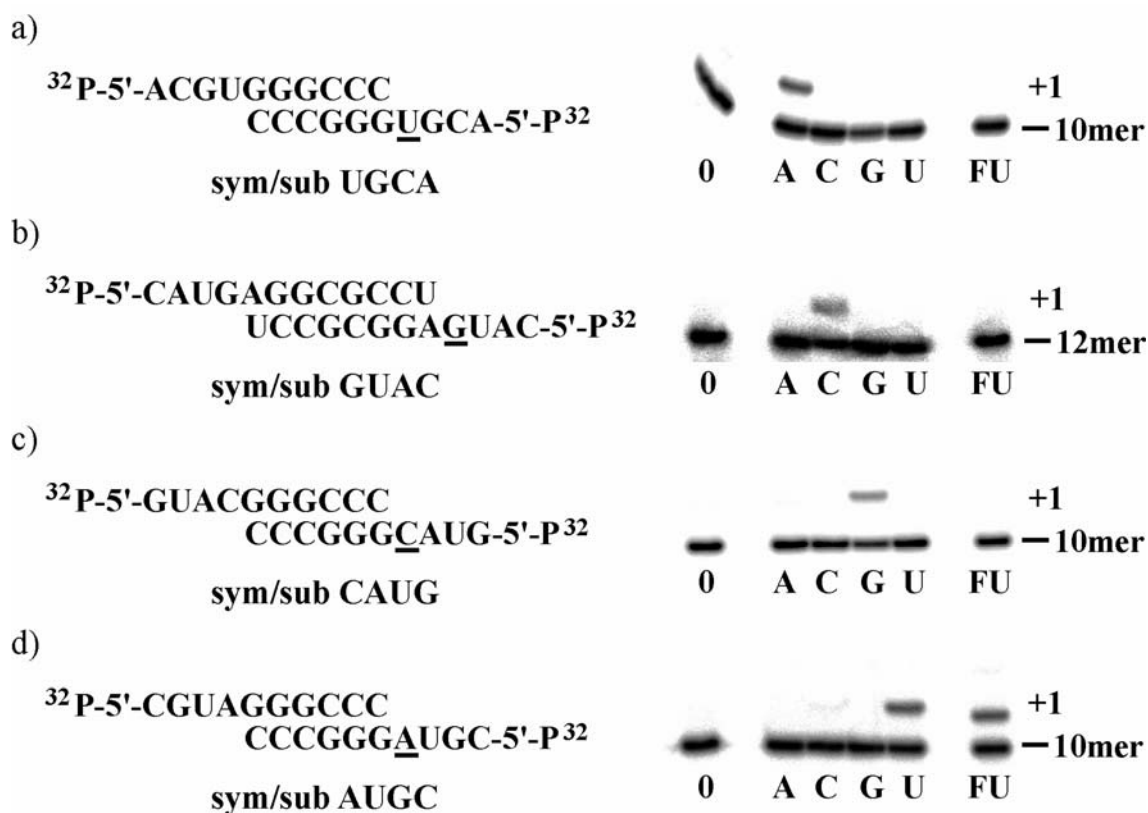


Figura 5.41 Incorporación de FUMP y otros nucleótidos por 3D en la posición +1 de RNAs heteropoliméricas. Se ha evaluado la capacidad de la polimerasa 3D de VFA de incorporar los nucleótidos estándar y FUMP frente a U, G, C ó A en el molde, usando distintos sym/sub marcados radiactivamente, e hibridados tal y como se describe en el apartado 4.24 de Materiales y Métodos. La mezcla de reacción, que incluye $2 \mu\text{M}$ 3D y $1 \mu\text{M}$ sym/sub, se incubaba durante 10 minutos a 37°C para permitir la formación del complejo 3D-RNA. La reacción se inicia con la adición del nucleótido correspondiente ($40 \mu\text{M}$), se incubaba durante 1 minuto a 37°C y se para añadiendo EDTA (83 mM concentración final). Los productos elongados se analizan como se describe en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos. Se indica la secuencia del complejo sym/sub utilizado y se subraya la base del molde que aparea con el nucleótido incorporado en +1. En la parte derecha de la figura se muestra el análisis electroforético de los productos de reacción utilizando nucleótidos estándar o FUTP (abreviados A, C, G, U ó FU; 0 indica que no se añade ningún nucleótido). **a)** incorporación de nucleótidos estándar y FUMP frente a U utilizando sym/sub UGCA. **b)** igual que a) utilizando sym/sub GUAC. **c)** igual que a) utilizando sym/sub CAUG. **d)** igual que a) utilizando sym/sub AUGC.

5.6.7 Determinación de la incorporación relativa de FUTP respecto a UTP

Ya que el producto de la elongación de sym/sub AUGC con FUMP en posición +1 muestra mayor movilidad electroforética que el mismo RNA elongado con UMP, se ha medido la incorporación relativa de FUMP frente a UMP en un mismo ensayo. Se realiza un ensayo tal y como se describe en la **Figura 4.6(c)** del apartado 4.26 de Materiales y Métodos, en el que se varía la concentración de FUTP (0 - $500 \mu\text{M}$) y se mantiene la de UTP constante ($50 \mu\text{M}$). A

partir de los datos de incorporación relativa obtenidos, se calcula el valor de $K_{0.5,app}[FUTP]$ que representa la concentración de FUTP necesaria para obtener la mitad de elongación total en un ensayo de elongación en presencia de 50 μM UTP. En concreto, $K_{0.5,app}[FUTP]$ es $143 \pm 10 \mu\text{M}$ (Figura 5.43). Este valor es 3 veces superior a la concentración de UTP utilizada en el ensayo (50 μM), por tanto, la polimerasa de VFA incorpora el UTP más eficientemente que el FUTP frente a A en el RNA en los ensayos de competición.

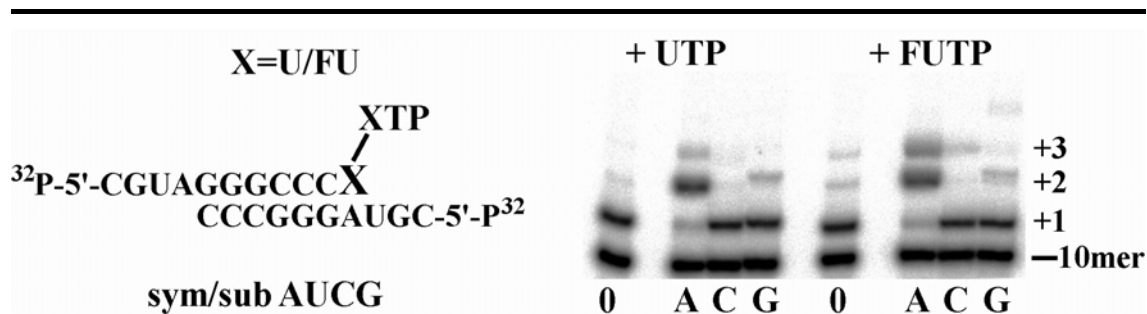


Figura 5.42 Extensión de RNA por 3D tras la incorporación de UMP o FUMP. El diseño experimental es el mismo que en la Figura 5.41. La reacción se inicia añadiendo 40 μM UTP ó FUTP (XTP) y se incuba durante 1 minuto. Esto permite la formación de un complejo molde iniciador elongado en posición +1. Se añade 40 μM ATP, CTP ó GTP (0 indica que no se añade ningún nucleótido) y se incuba 1 minuto a 37°C. A la derecha se muestra el análisis electroforético de los RNAs elongados en posición +1, +2 ó +3.

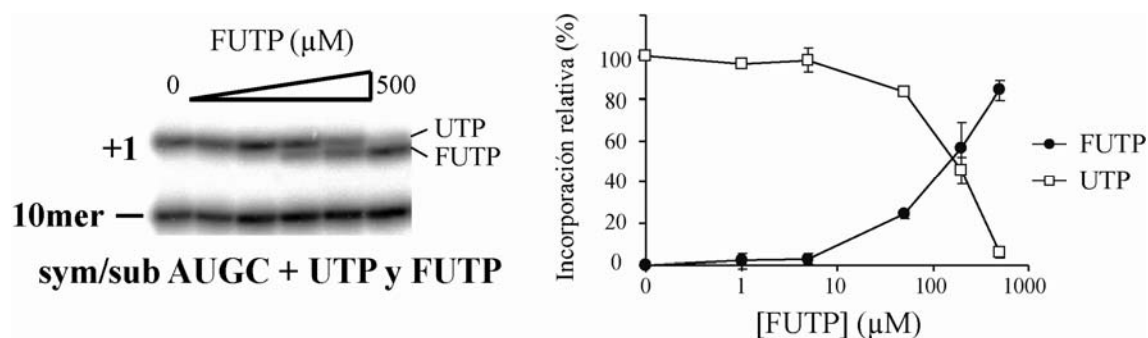


Figura 5.43 Incorporación relativa de FUTP respecto a UTP frente a A en el molde. Incorporación relativa de FUTP y UTP por 3D en la posición +1 del sym/sub AUGC utilizando concentración constante de UTP (50 μM) y variable de FUTP (0-500 μM). La movilidad electroforética del iniciador marcado depende de si ha sido elongado con UMP (menor distancia electroforética) ó FUMP (mayor distancia electroforética). A la derecha se indica la cuantificación de la incorporación relativa de los 2 nucleótidos en la competición. Los valores son el promedio de al menos 3 experimentos independientes; se dan las desviaciones estándares de las cuantificaciones por desitometría. El procedimiento para la realización del ensayo de elongación de moldes heteropoliméricos para la determinación de incorporación relativa de FUTP con respecto a UTP se describe en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos.

5.6.8 Incorporación de nucleótidos frente a FUMP como molde

Para estudiar el comportamiento de FU cuando está presente en el molde de RNA, se utiliza sym/sub FGCA que presenta FUMP en el molde en la posición que aparea con el nucleótido incorporado en posición +1. Se realiza un ensayo de incorporación con cada uno de los 4 nucleótidos estándar. Se observa que frente a FUMP se incorporan efectivamente AMP y GMP ($25\pm3\%$ y $17\pm0\%$ de elongación del iniciador, respectivamente) (**Figura 5.44**). Por tanto, FUMP en el molde dirige tanto la incorporación de AMP como de GMP, lo que favorecería la aparición de transiciones A→G (apartado 2.8.1.2.1 de Introducción).

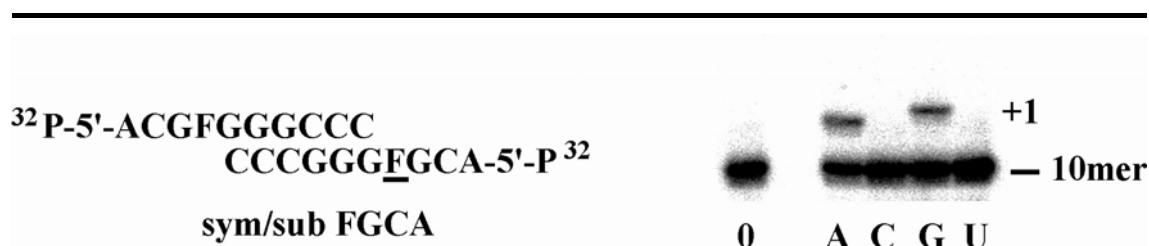


Figura 5.44 Incorporación de nucleótidos frente a FU en el molde. a) Secuencia del complejo molde-iniciador sym/sub FGCA que permite la incorporación de nucleótidos en la posición +1 frente a FU (F subrayada). b) El diseño experimental es el mismo que en la **Figura 5.41**. La reacción de polimerización se inicia añadiendo $40\ \mu\text{M}$ de ATP, CTP, GTP ó UTP (abreviados A, C, G, U; 0 indica que no se añade ningún nucleótido) y se incuba durante 1 minuto a 37°C . El análisis electroforético muestra el iniciador y el producto elongado en 1 nucleótido cuando se usa ATP ó GTP como sustrato.

5.6.9 Cinética de la incorporación incorrecto de GTP frente a U y FU

En colaboración con el Dr. Armando Arias se ha estudiado la cinética de incorporación incorrecta de GMP frente a U y FU tanto del nucleótido correcto ATP, como del incorrecto GMP, utilizando para ello sym/sub UGCA y sym/sub FGCA (**Figura 5.45**). La incorporación de nucleótido correcto AMP tanto frente a U como a FU en el molde, es muy rápida, y en 5 segundos de reacción, se observa una incorporación superior al 85% de la incorporación máxima en el ensayo [**Figura 5.45(b)**].

La incorporación del nucleótido incorrecto, GMP, sigue una cinética más lenta, lo que permite medir su velocidad de incorporación. La tasa de incorporación de $40\ \mu\text{M}$ GMP frente a FU en el molde es de $0,070\pm0,008\ \text{s}^{-1}$. Bajo las mismas condiciones de ensayo, la tasa de incorporación de GMP frente a U es de $0,004\pm0,000\ \text{s}^{-1}$ [**Figura 5.45(c)**]. Por tanto, el GMP se incorpora 17 veces más rápido frente a FU que frente a U y sugiere que la incorporación de FUMP en el molde favorece un aumento en el número de transiciones.

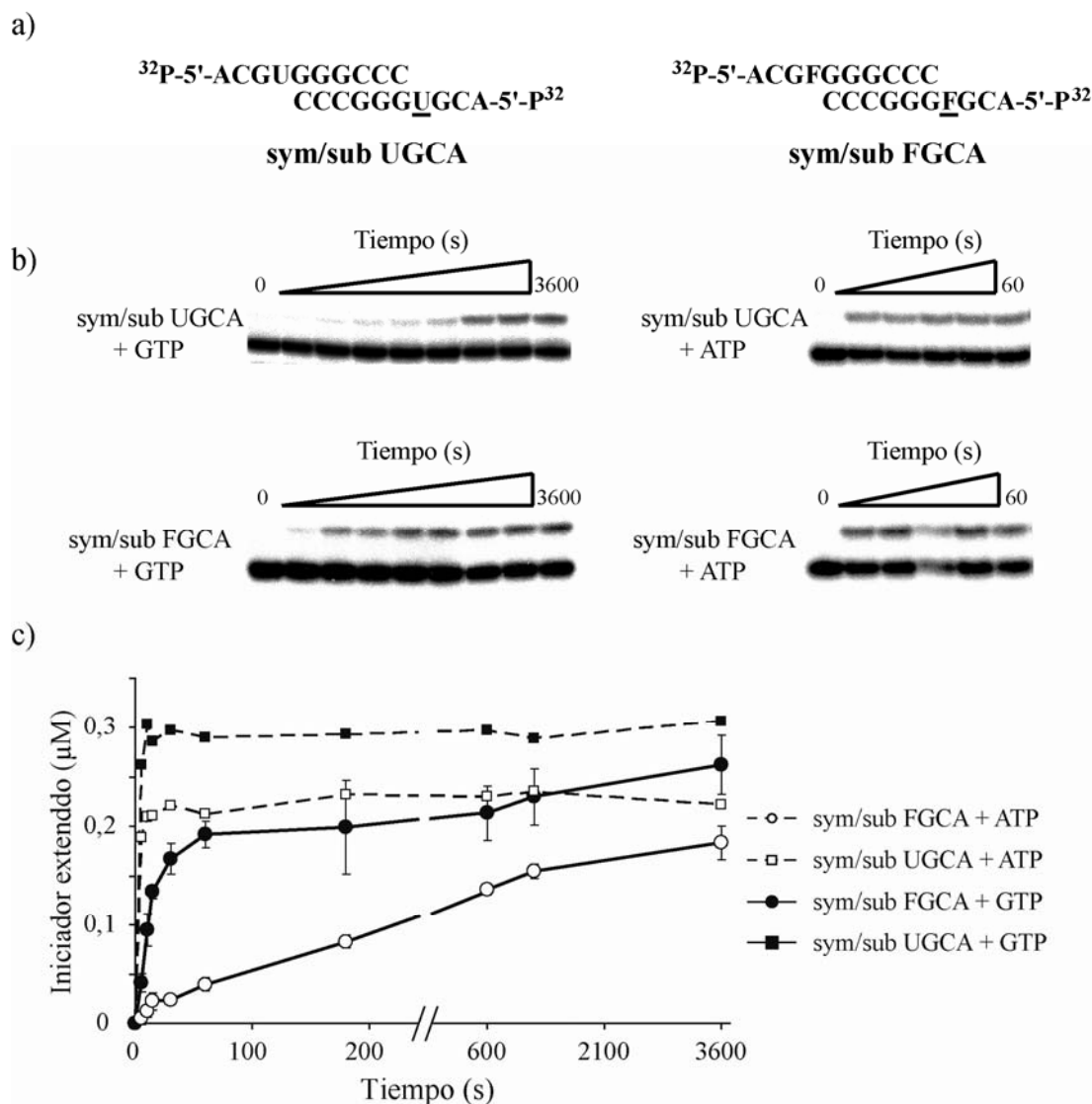


Figura 5.45 Cinética de incorporación del nucleótido correcto e incorrecto frente a UMP y FUMP. a) Secuencia de los sym/sub UGCA y FGCA utilizados en el ensayo. La base del molde que aparea con el nucleótido que se incorpora en posición +1 está subrayada. b) Se preincuba 1 μM sym/sub UGCA ó sym/sub FGCA marcado radiactivamente con 1 μM 3D durante 30 minutos a 37°C para permitir la formación del complejo 3D-RNA. Se añade un exceso (10 μM) sym/sub UGCA ó sym/sub FGCA no marcado para evitar la elongación de RNAs marcados que no se han unido a 3D durante la incubación. La reacción se inicia añadiendo 40 μM GTP (izquierda) o 40 μM ATP (derecha). Las reacciones se paran con la adición de 83 mM EDTA a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30, 60, 600, 1200 y 3600 segundos con GTP, y 5, 10, 15, 30 y 60 segundos con ATP). Los electroferogramas muestran el iniciador de RNA de 10 residuos y el producto elongado en 1 residuo. c) Cinéticas de incorporación de ATP o GTP usando el sym/sub UGCA ó sym/sub FGCA como complejos molde-iniciador. Los valores mostrados se han obtenido a partir de la cuantificación de los electroferogramas mostrados en b) tal y como se describe en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos. El análisis de la incorporación de ATP se ha realizado a partir de 1 experimento representativo. Los valores de incorporación de GTP han sido obtenidos a partir de al menos 3 experimentos independientes, se dan las desviaciones estándar.

5.6.10 Comparación de la inhibición de la síntesis de RNA por FUTP utilizando VPg u oligo(dT)₁₅

El FUTP ejerce una fuerte inhibición de la uridilación de VPg *in vitro* y además inhibe la síntesis de polímeros generados a partir de este cebador, probablemente de VPg-poli(U). Sin embargo, durante su incorporación como sustrato en la síntesis de RNA no actúa como terminador de cadena, y permite que la síntesis continúe. Podría argumentarse que los ensayos de elongación se realizan utilizando RNA heteropolimérico y Mg^{2+} como catión, mientras que la uridilación de VPg se realiza utilizando poli(A) como molde y Mn^{2+} como catión. Para investigar el efecto de FUTP en la polimerización de RNA en las mismas condiciones que la uridilación de VPg, se realiza un ensayo de síntesis de poli(U) utilizando oligo(dT)₁₅ como cebador, en presencia de concentraciones crecientes de FUTP o UTP frío (0-200 μ M) y usando como catión divalente Mn^{2+} . En este ensayo la IC_{50} para el FUTP es similar a la obtenida para el UTP (9 ± 3 μ M y 11 ± 4 μ M, respectivamente) (**Figura 5.46**). La inhibición por FUTP es específica de la uridilación de VPg, y no se observa en reacciones de polimerización llevadas a cabo en las mismas condiciones que la uridilación de VPg *in vitro*. La única diferencia entre ambos procedimientos es el cebador utilizado: VPg u oligo(dT)₁₅. Dado que la síntesis de polímeros VPg-poli(U) está también inhibida en presencia de FUTP (**Figura 5.36**) los datos sugieren que la incorporación de FUMP en VPg impide su actuación como cebador.

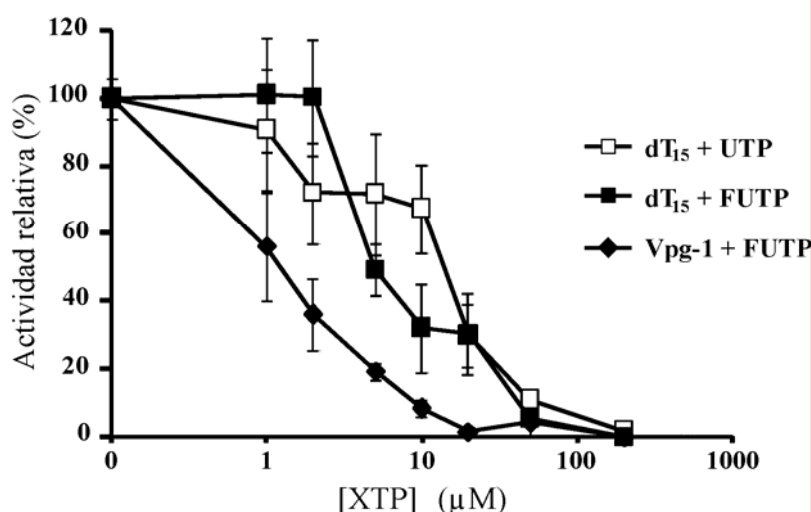


Figura 5.46 Inhibición por FUTP de la síntesis de poli(U) utilizando oligo(dT)₁₅ como cebador. La reacción de síntesis se lleva a cabo y se analiza tal y como se describe en el apartado 4.23.1 de Materiales y Métodos, utilizando $MnCl_2$ 0,6 mM en lugar de $MgCl_2$. Se representa el porcentaje de radiactividad incorporada en función la concentración de FUTP o UTP utilizada (indicado como XTP). Los resultados se obtienen a partir de al menos 3 experimentos independientes; se representan las desviaciones estándar.

5.6.11 Estudio de la inhibición de la uridilación de VPg *in vitro* por otros halogenoderivados de UTP

Recientemente en nuestro laboratorio hemos comprobado que tanto el 5-bromouracilo (Br) como 5-iodouracilo (I) son inhibidores de la replicación de VFA en cultivos de BHK-21 pero en menor medida que el 5-FU (A.I. de Ávila, M. Dávila y E. Domingo, resultados sin publicar). Dado que como FUTP, BrUTP e IUTP son análogos de UTP, se ha investigado si estos dos últimos compuestos inhibían la uridilación de la VPg *in vitro* por 3D. Para ello, se utilizan concentraciones crecientes de BrUTP o IUTP (0-50 μM) en el ensayo de uridilación de VPg *in vitro*. Los resultados (**Figura 5.47**) muestran que tanto BrUTP como IUTP son inhibidores de la uridilación de VPg aunque en menor medida que FUTP, con $\text{IC}_{50} = 4,3 \pm 1,1$ y $5,2 \pm 0,9$ μM , respectivamente (IC_{50} FUTP = $1,3 \pm 0,2$; apartado 5.6.2). Estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos en cultivos celulares e indican que los derivados halogenados de uracilo son capaces de inhibir la uridilación de VPg *in vitro*.

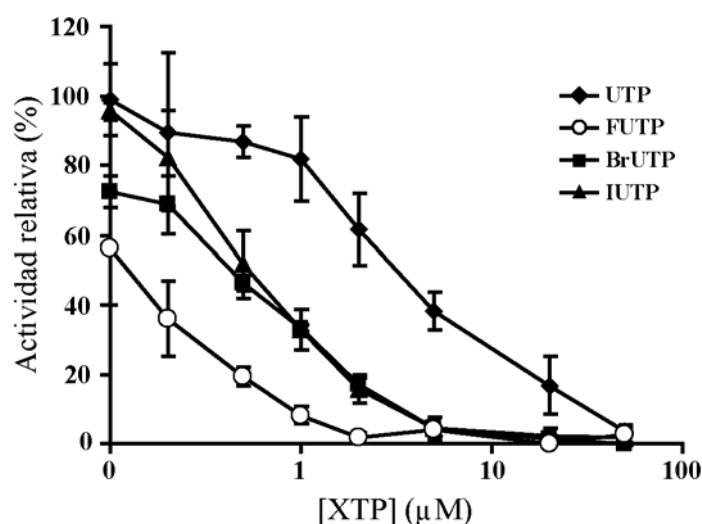


Figura 5.47 Inhibición de la uridilación de VPg por BrUTP e IUTP. Ensayo de uridilación de VPg realizado tal y como se indica en el apartado 4.23.3 de Materiales y Métodos en presencia de concentraciones crecientes (0-200 μM) de BrUTP e IUTP (indicado como XTP). Se representa la actividad relativa medida como porcentaje de VPg uridilada en función de la cantidad de nucleótido que se muestra en la leyenda incluida en la gráfica superior. Como comparación, se representan los datos de actividad relativa de uridilación de VPg en presencia de FUTP y UTP mostrados en la **Figura 5.36**. Los resultados se han obtenido a partir de al menos 3 experimentos independientes; se representan las desviaciones estándar.

Además, se comprueba que tanto el BrUTP como IUTP son incorporados por 3D en el RNA en ensayos de extensión de moldes heteropoliméricos tal y como está descrito en el apartado 4.26 de Materiales y Métodos, con A en el molde (**Figura 5.48**).

Todos estos datos apoyan el estudio de análogos de nucleósido que muestren una actividad dual, tanto mutagénica como inhibidora de la replicación viral, en diseños de terapias antivirales por mutagénesis letal.

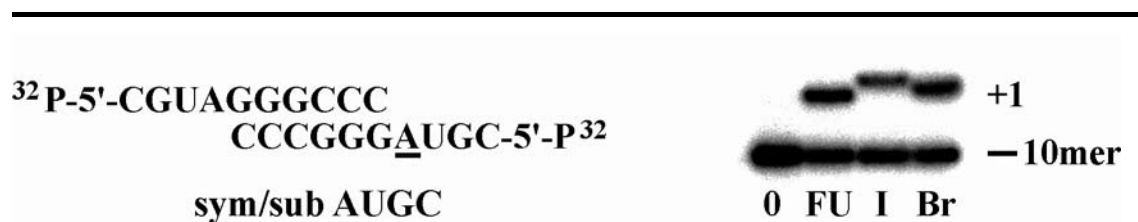


Figura 5.48 Incorporación de IUMP y BrUMP por 3D en posición +1 del sym/sub AUGC. El diseño experimental es el mismo que el mostrado en la leyenda de la **Figura 5.41**, utilizando 50 μ M de IUTP (I) o BrUTP (Br) como sustrato de la reacción. Como comparación se representa la incorporación de FUMP (FU). 0 indica que no se añade ningún nucleótido.

6. Discusión

6 Discusión

6.1 El estudio de las cuasiespecies apoya la mutagénesis letal como terapia antiviral

Los virus RNA replican con una tasa de error varios órdenes de magnitud superior a la observada normalmente en DNA celular y en muchos virus DNA. Este hecho, unido a sus altas tasas de replicación por unidad de tiempo y generalmente un elevado tamaño poblacional, conduce a una elevada diversidad genética que acelera la capacidad de adaptación del virus a los cambios ambientales. Como consecuencia de las altas tasas de error, las poblaciones de virus RNA son distribuciones complejas de mutantes denominadas cuasiespecies (apartado 2.1 de Introducción). La rápida evolución de los virus RNA conlleva importantes consecuencias médicas, ya que la mayor parte de las infecciones causadas por estos virus no pueden ser controladas de manera efectiva en la actualidad debido a la rápida selección de mutantes que escapan a drogas antivirales, vacunas y/o respuestas inmunes.

Existe, por tanto, la necesidad de explorar nuevas estrategias antivirales que tengan en cuenta la dinámica de cuasiespecies del patógeno diana. Una de estas estrategias, actualmente en estudio, consiste en forzar la entrada del virus en catástrofe de error mediante mutagénesis incrementada (mutagénesis letal). Se basa en aumentar artificialmente el número de errores durante la replicación viral más allá del umbral de error tolerable mediante el empleo de agentes mutagénicos (Anderson et al., 2004, Biebricher & Eigen, 2005, Biebricher & Eigen, 2006, Domingo, 2005, Drake & Holland, 1999, Eigen, 2002, Graci & Cameron, 2004) (apartado 2.2 de Introducción).

Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RpRd) son las proteínas responsables de la replicación de los virus RNA. La baja fidelidad de copia que presentan y la ausencia de una actividad correctora de errores son responsables, al menos en parte, de la alta frecuencia de mutación durante la replicación de los genomas virales (Batschelet et al., 1976, Domingo, 2007, Drake & Holland, 1999). Las interacciones entre las RdRp, RNA y los nucleótidos sustratos (NTPs) en el centro activo de la enzima determinan la fidelidad de copia de la polimerasa durante el proceso de replicación. Estudios estructurales han definido los aminoácidos de la RdRp de VFA (3D) que interaccionan con el molde-iniciador RNA (Ferrer-Orta et al., 2004) y los que interaccionan con nucleótidos estándar y con los análogos de nucleótido mutagénicos, 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) y ribavirina-5'-trifosfato (RTP) (Ferrer-Orta et al., 2007).

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la evolución de VFA sometida a incrementos en la concentración de R para profundizar en las bases moleculares de la extinción viral por mutagénesis y en los mecanismos de resistencia a la extinción por parte del virus. Este estudio ha permitido detectar la continua selección de mutantes de VFA en 3D en un proceso de adaptación a R y la existencia de otras proteínas virales como dianas de los mutágenos que también son susceptibles de adaptarse a la presencia de la droga.

6.2 La replicación con concentraciones crecientes de ribavirina conduce a la continua adaptación del VFA a la droga

Resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que R ejerce su actividad antiviral durante infecciones persistentes de VFA mediante mutagénesis letal (Airaksinen et al., 2003, Arias et al., 2005). Recientemente hemos obtenido una población de VFA con menor sensibilidad a R en infecciones citolíticas que presenta la sustitución M296I en la polimerasa del virus (Sierra et al., 2007). En este estudio se observó que la población resistente presentaba una alta heterogeneidad en el espectro de mutantes de 3D, sugiriendo que otras posibles mutaciones acompañantes a M296I en la región 3D y/o en otras regiones del genoma pudieran estar apareciendo como respuesta del virus a la droga (Sierra et al., 2007). Para profundizar en las bases moleculares de la acción mutagénica de R en infecciones citolíticas y determinar si se seleccionan nuevas mutaciones asociadas a la resistencia, se ha analizado el efecto de la replicación en presencia de concentraciones crecientes de R sobre esta población resistente (apartado 5.1 de Resultados).

La población de partida R-Ap35 (VFA MARLS pasado 35 veces en presencia de concentraciones crecientes de R, hasta 800 μ M R), presenta una alta heterogeneidad medida tanto por la frecuencia de mutación del espectro de mutantes como por el valor de la entropía de Shannon (S_n) de la región 3D, con respecto a una población control (apartados 5.1.3, 5.1.4 y 5.1.5 de Resultados). Tras 10 pases en presencia de la misma concentración de mutágeno, se obtiene una población (R-Ap45) cuya heterogeneidad disminuye, y tras otros 15 pases en presencia de concentraciones crecientes de R (hasta 5000 μ M R), la heterogeneidad vuelve a aumentar levemente (apartados 5.1.3, 5.1.4 y 5.1.5 de Resultados). Estos resultados reflejen la continua evolución del virus en su adaptación a R, explorando diversas soluciones posibles hasta la imposición de mutaciones que le confieran menos sensibilidad a R. Nuestra interpretación es que debido a la constante presión selectiva, se produce la eliminación de aquellas variantes con mutaciones que disminuyen la viabilidad del virus en presencia de R y la fijación de mutaciones que implican mayor adaptación a esta droga (comparar las poblaciones R-Ap35 y R-Ap45 en las **Tablas 5.2 y 5.5** de Resultados). Así, durante la evolución de R-Ap35 hacia R-Ap60, se mantienen mutaciones que otorgan menor sensibilidad a R (como la mutación que provoca la sustitución M296I en 3D), se acaban imponiendo completamente mutaciones en la secuencia consenso del virus (como la que codifica el cambio P44S en 3D) y se fijan otras mutaciones nuevas ante el aumento de presión selectiva (como la que codifica la sustitución P169S en la región 3D).

Los espectros de mutantes de las poblaciones R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60 muestran un valor de S_n igual a 1 (apartado 5.1.4 de Resultados), ya que todas las secuencias analizadas son diferentes, independientemente de la carga mutacional de cada una de ellas. Como consecuencia, el valor de S_n no resulta un buen estimador de la heterogeneidad en poblaciones altamente mutadas como las aquí estudiadas. Por esta razón, las secuencias del espectro de mutantes de cada una de estas poblaciones se han sometido a un análisis por PAQ (*Partition Analysis of Quasispecies*) realizado en nuestro laboratorio por el Dr. Samuel Ojosnegros (Ojosnegros et al., 2008). Este análisis permite estudiar la estructura intrapoblacional de la

cuasiespecie mediante una comparación clon a clon. Los resultados obtenidos corroboran la idea de que la diversidad de la población se expande debido a la influencia de la R y que tras la imposición de la mutación de resistencia M296I, se reduce la diversidad poblacional hasta valores que se mantienen hasta el pase 60 (población R-Ap60). El estudio de la relación entre mutaciones sinónimas y mutaciones no sinónimas encontradas a lo largo del genoma en las poblaciones MARLS pasadas en presencia de R también indica que la presencia de la droga ha eliminado aquellas variantes menos aptas para replicar bajo la presión selectiva de R (selección purificadora) (Ojosnegros et al., 2008).

6.3 El espectro de mutantes indica que RMP se incorpora preferentemente frente a C en el genoma de VFA

Al igual que ocurre tanto en infecciones persistentes (Airaksinen et al., 2003) como citolíticas (Sierra et al., 2007) el espectro de mutantes de las poblaciones de VFA pasadas en presencia de R muestra un aumento significativo en la proporción de las transiciones C→U y G→A en relación al resto de mutaciones (**Tabla 5.4** de Resultados). Las transiciones C→U y G→A son las esperadas como resultado de la incorporación incorrecta de RMP frente a C y la posterior incorporación de UMP frente a R (**Figura 2.19** de Introducción). Como se indica en el apartado 2.8.2.2.5 de Introducción, estudios bioquímicos han demostrado que 3D de VFA incorpora RMP igual de eficazmente frente a C como frente a U (Arias et al., 2008). El tratamiento de células BHK-21 con R produce un descenso en los niveles intracelulares de GTP de 5 veces debido probablemente a la inhibición de la IMPDH, implicada en la síntesis de GTP (apartado 2.8.2.2.1 de Introducción). Es posible que este descenso en los niveles de GTP facilite la incorporación incorrecta de RMP frente a C, provocando el patrón de mutaciones observado. En nuestro laboratorio se ha demostrado que durante infecciones persistentes de VFA tratadas con R, la adición de guanosina en el medio de cultivo, encaminada a recuperar los niveles intracelulares de GTP, no alteraron este patrón de transiciones (Airaksinen et al., 2003). Por lo tanto sería necesario realizar más estudios encaminados a dilucidar los mecanismos que favorecen este patrón de transiciones en infecciones del virus en cultivos celulares.

6.4 La adaptación del VFA en presencia de R es específica para esta droga y conlleva un coste en la eficacia biológica del virus

Durante los pases en presencia de R, se produce una continua disminución de la infectividad específica del virus, siendo 10 veces inferior en R-Ap60 que en R-Ap35 (apartado 5.1.2). Además, el *fitness* de las poblaciones virales R-Ap35, R-Ap45, R-Ap60 en ausencia de R con respecto al virus Ap9 (virus MARLS pasado 9 veces en ausencia de R) es 0,5 0,6 y 0,6 respectivamente, mostrando que la adaptación a la droga produce una pérdida de eficacia biológica de estas poblaciones.

En presencia de 800 µM R, los valores de *fitness* relativos de R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60 aumentan, indicando una clara ventaja selectiva con respecto a Ap9 (*fitness* relativo de 4,

4 y 11 para R-Ap35, R-Ap45 y R-Ap60, respectivamente). La secuencia consenso de R-Ap35 es muy heterogénea y presenta mutaciones en mezcla que se imponen posteriormente en la población R-Ap45 (**Tabla A.2** de Anexo). Por ejemplo, la mutación que se impone completamente en la región 3D de R-Ap45 (P44S) está presente en el espectro de mutantes de la población R-Ap35 con una frecuencia de 0,7 (**Tabla 5.5** de Resultados). Por ello, no es extraño que los valores de *fitness* de estas 2 poblaciones, en ausencia y presencia de R, sean similares. El valor de eficacia biológica del virus R-Ap60 en presencia de 5000 μ M R, es 15, lo que indica una gran ventaja selectiva de R-Ap60 frente a Ap9 durante la replicación en presencia de altas concentraciones de R (apartado 5.1.6 de Resultados).

Para determinar si la ventaja selectiva de R-Ap60 es específica a R, o por el contrario a la presencia de cualquier agente mutagénico en el medio, se ha realizado una competición entre R-Ap60 y Ap9 en presencia de hidrocloreuro de guanidinio (GuH) y 5-fluorouracilo (FU), obteniéndose un valor de *fitness* de 0,7. Este dato sugiere que la evolución de VFA MARLS durante los pases en presencia de R está dirigida a la adaptación específica a este mutágeno. El resultado es muy relevante para el posible uso terapéutico de mutágenos en infecciones virales, ya que la adaptación a R no genera resistencia cruzada a otro mutágeno como FU.

6.4.1 Mutaciones en 3D contribuyen a la resistencia del VFA a R

Para estudiar específicamente el papel de 3D en la resistencia a R, se han construido clones infecciosos que codifican polimerasas mutantes con las mutaciones P44S, P169S y/o M296I con los que se han realizado cinéticas de producción viral, de RNA, y ensayos de competición en cultivos celulares. Los virus con la mutación M296I, sola o acompañada [pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M)] muestran una leve reducción en la producción viral y en la cinética de síntesis de RNA con respecto a pMT28 (apartado 5.1.7 y 5.1.8 de Resultados), lo que indica que estos virus pueden tener un defecto durante la síntesis del RNA. En este sentido, un reciente estudio realizado por el Dr. Armando Arias en colaboración con el grupo del Dr. Craig Cameron muestra que la polimerasa 3D *wt* es al menos 2 veces más rápida en la incorporación de nucleótido que 3D(M296I) (Arias et al., 2008).

Los resultados obtenidos en las competiciones virales en ausencia de R muestran una clara concordancia con los obtenidos en la cinética de producción viral (apartado 5.1.7 de Resultados): los virus pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(2M) y pMT28-3D(3M) muestran un leve defecto de *fitness* con respecto a pMT28 (0,6; 0,7 y 0,7) mientras que pMT2-3D(P44S) y pMT28-3D(P169S) presentan un valor de eficacia biológica similar al virus *wt* (apartado 5.1.9). Estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos con las poblaciones virales MARLS y con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (Sierra et al., 2007), indicando que la adquisición de M296I, tanto sola o acompañada, causa una ligera pérdida de *fitness*.

La eficacia biológica relativa de pMT28-3D(M296I) y pMT28-3D(2M) en presencia de 800 μ M R es 4 y 3, respectivamente. Estos valores concuerdan con los valores de *fitness* de las poblaciones R-Ap35 y R-Ap45, respectivamente, y pone de manifiesto que las mutaciones originadas en 3D durante la evolución de VFA en presencia de R contribuyen en gran medida en la resistencia del virus a R.

Como se ha comentado anteriormente, las poblaciones R-Ap35 y R-Ap45 tienen secuencias consenso similares, pero presentan varios puntos de heterogeneidad (**Tabla A.2** de Anexo), de modo que no está claro el papel de las distintas mutaciones en la respuesta del virus a la droga. Sin embargo, pMT28-3D(M296I) y pMT28-3D(2M) son poblaciones clonales que sólo se diferencian de pMT28 en las mutaciones presentes en 3D. La similitud entre la eficacia biológica de pMT28-3D(M296I) y pMT28-3D(2M), puede significar que la imposición de la sustitución P44S en 3D es sólo necesaria en el contexto de secuencia del virus MARLS pasado en presencia de R.

El valor de *fitness* de pMT28-3D(3M) respecto a pMT28 en presencia de R difiere mucho del valor de *fitness* de R-Ap60 con respecto a Ap9 en las mismas condiciones (apartado 5.1.6 y 5.1.9 de Resultados). Esta gran diferencia podría deberse a 2 razones fundamentalmente: diferencia en el contexto genético donde se encuentran las mutaciones en 3D (R-Ap60 tiene un total de 32 mutaciones no sinónimas fuera de 3D con respecto a pMT28) y diferencia en el espectro de mutantes de ambas poblaciones, es decir, R-Ap60 es una población MARLS con 60 pases en presencia de concentraciones crecientes de R, mientras que pMT28-3D(3M) es una población clonal con solo 2 pases en ausencia de R antes de comenzar la competición.

pMT28-3D(P169S) presenta resistencia a R, con valor de *fitness* en presencia de 5000 μ M R mayor al del virus pMT28-3D(3M) (3 con respecto a 2, apartado 5.1.9 de Resultados), indicando que la sustitución P169S en 3D, por sí sola, permite la adaptación a VFA a altas concentraciones de R. Esta idea está de acuerdo con el hecho de que pMT28-3D(3M) presenta una gran desventaja selectiva con respecto a pMT28-3D(2M) [virus que se diferencia de pMT28-3D(3M) solamente por la ausencia de la sustitución P169S en 3D], tanto en ausencia como en presencia de 800 μ M R, pero muestra ventaja selectiva en presencia de 5000 μ M R (apartado 5.1.9 de Resultados). Así, VFA MARLS podría haber evolucionado adaptándose a un ambiente de incremento constante en la concentración de R, produciéndose una aparición secuencial de mutaciones. Bajo estas condiciones, la sustitución M296I permite la adaptación a concentraciones bajas de R, mientras que P169S confiere mayor ventaja frente a altas concentraciones de R. Tal vez si la concentración de R hubiese sido alta desde el inicio de los pases de MARLS, la secuencia de aparición de mutaciones hubiese sido distinta. Datos preliminares demuestran que en un variante de VFA de alto *fitness*, pasado constantemente en presencia de 5000 μ M R, se selecciona P169S, en ausencia de otras mutaciones en 3D (Armando Arias, resultados no publicados).

6.5 Análisis bioquímico del mecanismo de resistencia a ribavirina en polimerasas de VFA

Los ensayos *in vitro* empleando las distintas polimerasas mutantes sugieren que al menos parte del comportamiento fenotípico del VFA adaptado a R se debe a una menor capacidad de incorporar R durante la síntesis de RNA (apartado 5.2.4.2 de Resultados). Los ensayos de actividad y de afinidad por el molde (apartado 5.2.2 y 5.2.3 de Resultados) muestran sobre todo el efecto perjudicial que tiene la sustitución P44S, tanto de manera individual como acompañada de otras mutaciones, en la actividad de 3D. Sin embargo, todos los virus mutantes

muestran menor capacidad replicativa que el virus *wt* en ausencia de R (apartado 5.1.8 de Resultados). La diferencia entre el comportamiento de las enzimas y de los correspondientes virus durante infecciones en ausencia de R, aunque sea modesta, sugiere que los ensayos realizados *in vitro* con las polimerasas purificadas no reflejan todas las funciones que la polimerasa tiene en el ciclo de infección. Ello está de acuerdo con la participación de precursores como 3CD o 3BCD en otras funciones virales (Bedard & Semler, 2004, Pathak et al., 2008).

Se han realizado varios experimentos encaminados a averiguar el comportamiento de RTP como sustrato para las enzimas mutantes. En el experimento de extensión con moldes homopoliméricos de RNA, todas las enzimas mutantes mostraron menor capacidad de incorporar RMP frente a G que 3D *wt*, excepto 3D(P169S) (apartado 5.2.4.1) Este resultado resulta incongruente a la vista de los obtenidos con el virus pMT28-3D(P169S) en cultivos. Creemos que una razón de esta disparidad de resultados es que las condiciones de este ensayo se alejan mucho de las condiciones fisiológicas. Entre otras cosas, en el ensayo de incorporación de RMP frente a C se utiliza un poli(C) como molde y un iniciador de DNA. Además, la cantidad de RTP está 100.000 veces en exceso con respecto al GTP con el que compete.

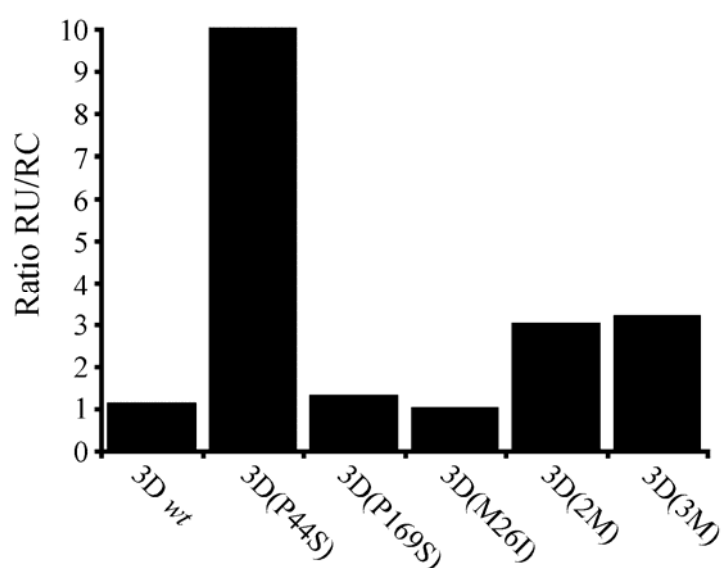


Figura 6.1 Relación de la incorporación RU/RC por 3D *wt* y mutantes. Representación de la relación entre la incorporación incorrecta de R frente a U en el molde de RNA, con respecto a la incorporación incorrecta de R frente a C en el molde de RNA para todas las polimerasas estudiadas. Se utilizan los datos mostrados en el apartado 5.2.4.2 de Resultados de incorporación incorrecta de R frente a U en posición +2 utilizando el sym/sub AUGC, y de incorporación incorrecta de R frente a G en posición +2 utilizando el sym/sub ACGU. Se considera que la incorporación correcta en el RNA de A frente a U y de G frente a C, es similar en todas las polimerasas estudiadas (apartado 5.2.4.2 de Resultados). En el caso de 3D(P44S), la incorporación incorrecta de R frente a C se considera igual al límite de detección (0,5% de sym/sub elongado; apartado 5.2.4.2 de Resultados).

Para estudiar la incorporación de RMP en condiciones más semejantes a las fisiológicas, se han realizado ensayos de incorporación de RMP frente a C o U en el molde utilizando

complejos de RNA heteropoliméricos. En estos ensayos, todas las polimerasas mutantes utilizadas muestran una incorporación de AMP y GMP frente al nucleótido correcto similar a la de 3D, mientras que presentan una menor capacidad que 3D de incorporar RMP, tanto frente a U, como frente a C, en el molde de RNA (apartado 5.2.4.2 de Resultados). En el caso de 3D *wt*, 3D(M296I) y 3D(P169S), la relación de incorporación de R frente a U con respecto a la incorporación de R frente a C (ratio RU/RC) es similar a 1 (**Figura 6.1**). Este dato está de acuerdo con los resultados enzimológicos para 3D(M296I) (Arias et al., 2008). Sin embargo, en 3D(P44S) el valor del ratio RU/RC es al menos de 10, indicando una clara predilección por parte de la polimerasa 3D(P44S) de incorporar RMP como análogo de A, más que como análogo de G (**Figura 6.1**). Esta característica es extensible en menor medida a las polimerasas 3D(2M) y 3D(3M), las cuales incluyen la sustitución P44S, que presentan una incorporación de R frente a U 3 veces mayor que la incorporación de R frente a C (ratio RU/RC = 3 y 3,2, respectivamente; **Figura 6.1**). Este comportamiento de las polimerasas con la sustitución P44S durante el apareamiento de RMP puede ser el reflejo de un mecanismo diferente de resistencia a R que el mostrado por 3D(M296I) (Arias et al., 2008).

El análisis de la incorporación de CMP o UMP frente a RMP en un molde de RNA por parte de las distintas polimerasas estudiadas en esta Tesis Doctoral, proporcionaría una valiosa información sobre el mecanismo de resistencia que muestran los distintos mutantes de 3D frente a R. Sin embargo, por problemas técnicos no se han conseguido RNAs molde que presenten RMP en su secuencia para realizar este tipo de experimentos.

6.6 La polimerasa de VFA tiene varios mecanismos para modular la respuesta a R

La generación de variantes virales resistentes a agentes antivirales está dificultando el control de un gran número de enfermedades importantes ocasionadas por los picornavirus y otros virus RNA. Las mutaciones en 3D que permiten la viabilidad del virus en presencia de R proporcionan un modelo para estudiar la dinámica de generación de mutantes resistentes a agentes mutagénicos y su comportamiento evolutivo. En este sentido, un mecanismo podría ser la adquisición de mutaciones que confieran mayor fidelidad de copia a la polimerasa, limitando la incorporación de cualquier nucleótido incorrecto, tal y como se ha descrito para el mutante G64S de poliovirus (PV) (Arnold et al., 2005, Pfeiffer & Kirkegaard, 2003, Vignuzzi et al., 2006). Otra posibilidad sería que la mutación confiriera una menor capacidad de emplear RTP específicamente como sustrato. Este parece ser el mecanismo asociado a la mutación M296I de VFA descrita en nuestro laboratorio (Sierra et al., 2007), ya que los datos tanto de cultivos celulares, como *in vitro*, no mostraron una mayor fidelidad de copia de este mutante, sino una menor frecuencia de incorporación de RMP respecto al nucleótido correcto que 3D *wt* (Arias et al., 2008, Sierra et al., 2007).

El análisis estructural del complejo de la polimerasa de VFA con un RNA molde-iniciador y los sustratos naturales (ATP/UTP) o con RTP (Ferrer-Orta et al., 2007) ha permitido proponer un posible efecto de la mutación M296I en la sensibilidad a R del VFA tal y como se detalla en (Sierra, 2007). El aminoácido M296 se encuentra situado en el bucle flexible $\beta 9\text{-}\alpha 11$

del dominio *fingers* de la polimerasa (**Figura 6.2**), que interacciona con el nucleótido entrante y podría participar en la discriminación de nucleótidos correctos e incorrectos (Ferrer-Orta et al., 2004, Ferrer-Orta et al., 2007). La sustitución M296I podría afectar la conformación y flexibilidad del bucle, alterando las interacciones con el NTP entrante o con la base aceptora del molde. Se han descrito mutaciones, tanto en DNA polimerasas como en la RT de HIV, bien cercanas o alejadas del centro activo de la polimerasa, que pueden tener efectos en la fidelidad del enzima como resultado de cambios dinámicos y/o estáticos en el tamaño y flexibilidad del centro activo (Harris et al., 1998, Kim et al., 1999, Kim et al., 2006, Osherooff et al., 1999). En la actualidad, el grupo de la Dra. Nuria Verdager está realizando la co-cristalización de las polimerasas mutantes estudiadas en esta Tesis Doctoral en complejo con un molde RNA con GTP, ATP y/o RTP para proponer un mecanismo más preciso de la participación de las mutaciones P44S, P169S y M296I en la discriminación de RTP.

El residuo P169 mapea en el motivo F del subdomino *fingers* conservado en las RdRps (apartado 2.6.1 de Introducción). Se encuentra flanqueado por los aminoácidos básicos R168 y K172 encargados de la coordinación del grupo trifosfato del nucleótido entrante, y está cercano al motivo conservado KDE de unión a RNA (Ferrer-Orta et al., 2006b, Ferrer-Orta et al., 2004). P169 no está conservado en picornavirus y corresponde a la posición S164 en PV. Por su situación, parece un candidato ideal para ser un determinante de fidelidad en 3D. En la presente Tesis Doctoral se muestra que las polimerasas con el cambio P169S muestran una menor capacidad de incorporar RMP frente a C y U en el molde. Además, el espectro de mutantes derivado de pMT28-3D(3M) tiene un número menor de mutaciones que el de pMT28 tanto en ausencia como en presencia de 5000 μ M R (apartado 5.1.12 de Resultados).

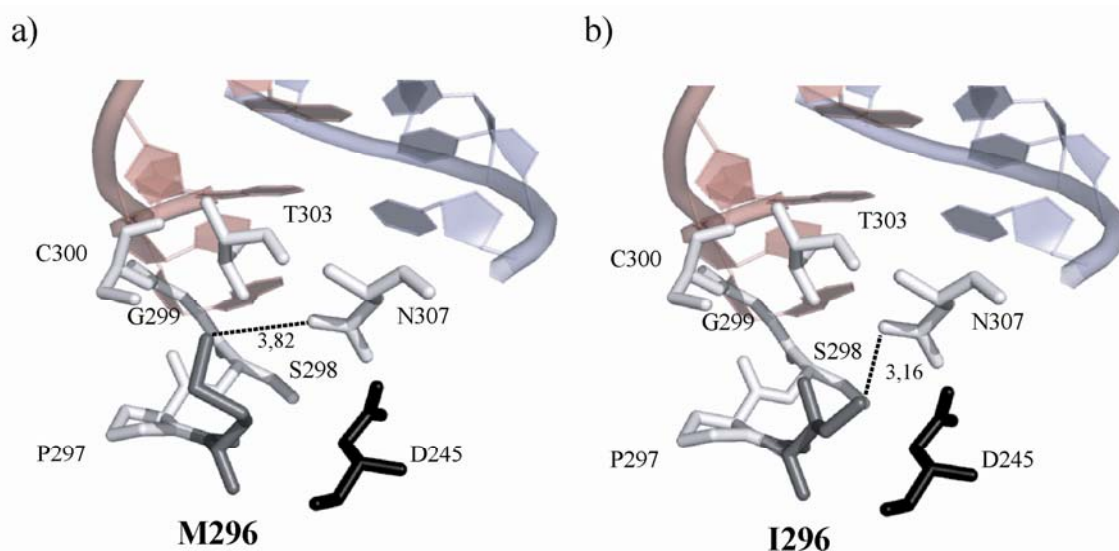


Figura 6.2 Esquema de los aminoácidos que contactan directamente con M296. a) Se representan M296 (en gris) y los aminoácidos que contactan con este residuo (en blanco). Se muestran el RNA molde (rojo) y el RNA cebador (azul) como referencia. M296 se encuentra en contacto con N307 y el aspártico catalítico D245 (en negro), que juegan un papel fundamental en el reconocimiento del nucleótido ya que sus cadenas laterales establecen puentes de hidrógeno con el grupo 2' OH de la ribosa (Ferrer-Orta et al., 2006b, Ferrer-Orta et al., 2007). M296 también está próximo a los residuos C300 y T303, que establecen contactos con la base del NTP y con los residuos conservados

S298 y G299, los que, a su vez, contactan con la base del NTP y RTP (Ferrer-Orta et al., 2007). Se indica la distancia en Å entre el residuo 296 y el 307. **b)** Igual que a) modelando en la posición 296 un residuo de isoleucina. Las figuras se han realizado empleando el programa *pymol* (DeLano Scientific LLC). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>; código 1WNE).

6.6.1 La sustitución P44S en 3D favorece la aparición de transiciones U→C y A→G

En las competiciones realizadas con pMT28-3D(P44S), la mutación P44S en 3D no otorga ninguna ventaja o desventaja del virus en presencia o ausencia de R (apartado 5.1.9 de Resultados). De acuerdo con los datos presentados en esta Tesis Doctoral, la polimerasa de VFA durante el tratamiento con R evoluciona para adquirir el cambio P44S que tiene una preferencia por incorporar RMP frente a U en lugar de frente a C, lo que conduciría a la reducción de las transiciones C→U y G→A durante el tratamiento con R. Esta reducción se confirma en los espectros de mutantes de las poblaciones de VFA pasadas en presencia de R que contienen la polimerasa 3D(3M) (apartado 5.1.12.1 de Resultados). Estas poblaciones tienen una mayoría de transiciones de tipo U→C y A→G, mientras que en poblaciones *wt* tratadas con R, las transiciones mayoritarias son de tipo C→U y G→A (Sierra et al., 2007). El mantenimiento de un determinado patrón de transiciones está relacionado con la composición de nucleótidos del genoma y con el mantenimiento de la información genética. Existen varias causas que justifican patrones asimétricos durante la aparición de transiciones: preferencia por el uso de determinados codones, mantenimiento de estructuras secundarias de RNA, conservación de secuencias de RNA con función propia, etc. (Frank & Lobry, 1999, Galtier & Lobry, 1997, Hurst & Merchant, 2001, Wang & Hickey, 2002). Dado que la conservación de estructuras secundarias en el RNA de VFA es necesaria para la funcionalidad del genoma, la tendencia a que aumenten las transiciones U→C y A→G en presencia de R para contrarrestar el aumento de transiciones C→U y G→A puede ser favorable para compensar posibles mutaciones deletéreas. Así, una polimerasa mutante con una predilección para incorporar RMP frente a U en lugar de frente a C, mitigará los efectos producidos por el incremento de las transiciones C→U y G→A y conferirá una ventaja a VFA.

Experimentos bioquímicos preliminares parecen indicar que el incremento de transiciones U→C y A→G producido por la polimerasa 3D(3M), no es exclusivo para el apareamiento incorrecto de RMP frente a U. Esta enzima incorporaría incorrectamente ~2 veces más GMP frente a U, que UMP frente a G, lo que favorecería, de acuerdo con los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral, un incremento de las transiciones U→C y A→G en el espectro de mutantes de pMT28-3D(3M) tanto en presencia, como en ausencia de R (apartado 5.1.12.1).

Existen varios casos documentados de mutantes de polimerasas que promueven específicamente la aparición de ciertos tipos de mutaciones durante la replicación. La sustitución R283K en la polimerasa pol β provoca un incremento de 10 veces en incorporación incorrecta de dCMP frente a T o A en el molde, con respecto a la polimerasa *wt*; sin embargo, ambas muestran la misma fidelidad en incorporar dGMP frente a T o A en el molde (Osheroff et al., 1999). El mutante de infidelidad E710A de la DNA polimerasa I de *E. coli* muestra

preferentemente incorporación incorrecta de pirimidinas (Minnick et al., 1999). Sorprendentemente, el mutante de fidelidad incrementada R72A de la retrotranscriptasa de VIH-1, presenta incorporación incorrecta de GMP frente a T, en un determinado contexto de secuencia, hasta 170 veces mayor que la observada con la proteína *wt* (Lewis et al., 1999).

Los datos mostrados en la **Figura 5.16** (apartado 5.2.4.2 de Resultados) también indican un defecto en la capacidad de las polimerasas mutantes con las sustituciones P44S y/o P169S, tanto solas como acompañadas, de elongar RNA en presencia de RTP con respecto a 3D *wt* y 3D(M296I). Una menor tasa de elongación del RNA en estas condiciones puede constituir un mecanismo adicional de resistencia a R mediante el cual, estas polimerasas, dispondrían de un mayor tiempo para chequear los contactos adecuados que se forman entre 3D, NTP entrante y RNA naciente, durante la síntesis del RNA viral.

La posibilidad de elongar un RNA en el que ha sido incorporado previamente RMP, permite explicar la viabilidad del virus pMT28-3D(P44S) en presencia de R (apartado 5.1.9 de Resultados), cuya polimerasa puede incorporar R frente a C en el molde, en presencia del nucleótido que se incorpora correctamente en la posición siguiente (comparar **Figuras 5.15 y 5.16** de Resultados).

La posición P44 se encuentra conservada entre las polimerasas de otros picornavirus y mapea en el subdominio *finger tips* de 3D (Ferrer-Orta et al., 2004), alejada del centro activo de la enzima. Sin embargo, está cerca del sitio de reconocimiento del nucleótido entrante. Los datos preliminares obtenidos por el grupo de la Dra. Nuria Verdaguer a partir de las estructuras con polimerasas mutantes, muestran que tal vez sea durante la captación del nucleótido entrante, más que durante su estabilización en el centro activo y su posterior incorporación al RNA naciente, donde resida la capacidad discriminatoria frente a R de la sustitución P44S (comunicación personal de Nuria Verdaguer). Se requieren estudios bioquímicos adicionales encaminados a determinar si los cambios P44S y P169S son mutantes de fidelidad, como G64S en 3D de PV, o si discriminan específicamente RTP, como ocurre con M296I en 3D de VFA.

Resulta intrigante que la polimerasa 3D(P44S) muestre tan bajos niveles de incorporación *in vitro* con respecto a 3D *wt*, mientras que el clon infeccioso correspondiente pMT28-3D(P44S) no tiene ninguna diferencia en infectividad o en *fitness* con respecto a pMT28 (apartados 5.1.7 y 5.1.9 de Resultados). Probablemente información sobre las frecuencias de mutación *in vitro* de 3D(P44S) y la medida de la frecuencia de error y el tipo de transiciones originadas en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28-3D(P44S) sea de utilidad para explicar el comportamiento de esta mutación en el contexto de 3D de VFA en cultivos celulares.

6.7 El virus que codifica la polimerasa 3D(3M) es resistente a la extinción mediada por R

La extinción por mutagénesis letal está asociada a la disminución de la infectividad específica e incrementos en la frecuencia de mutación sin variación de la secuencia consenso de la población (Gonzalez-Lopez et al., 2005, Grande-Perez et al., 2005). Estas propiedades distinguen a la extinción por mutagénesis letal de la extinción mediada únicamente por inhibición de la replicación viral. Los resultados mostrados en la presente Tesis Doctoral (apartado 5.2 de Resultados) indican que VFA *wt* (pMT28) se extingue tras mutagénesis letal mediada por R. Sin embargo, el VFA mutante que contiene las sustituciones P44S, P169S y M296I en 3D [pMT28-3D(3M)] es resistente a la extinción. Los datos obtenidos permiten explicar la resistencia a la extinción de pMT28-3D(3M) al menos por 3 causas (complementarias):

i) Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio mostraron que una baja capacidad replicativa (*fitness*) y bajas cargas virales (bajo tamaño poblacional) favorecen la extinción viral (Sierra et al., 2000). Cuanto menor sea la oportunidad de un virus de replicar, menor será la probabilidad de sobrevivir ante una respuesta antiviral. El virus pMT28-3D(3M) tiene un valor de *fitness* unas 2 veces superior al de pMT28 en presencia de 5000 μ M R (apartado 5.1.9 de Resultados). En estas condiciones, el virus mutante muestra una menor reducción de infectividad que el virus *wt* durante los pases en presencia del mutágeno. Esto implica, que en sucesivas rondas de infección en presencia de 5000 μ M R, pMT28 producirá menor progenie que pMT28-3D(3M), disminuyendo, por tanto, el repertorio de variantes que puedan mostrar resistencia a la droga.

ii) Mediante el análisis del espectro de mutantes, se ha constatado que durante los pases hacia la extinción viral, la frecuencia de mutación de pMT28 alcanza un valor cercano a 20×10^{-4} sustituciones incorrectas por nucleótido en la población preextinción, mientras que en el caso de pMT28-3D(3M) la frecuencia de mutación presenta valores que van desde 13×10^{-4} en el pase 2, hasta 14×10^{-4} sustituciones incorrectas por nucleótido en el pase 10 (apartado 5.1.12 de Resultados). Se ha descrito con anterioridad que leves aumentos en la frecuencia de mutación pueden conducir al virus a la entrada en catástrofe de error por mutagénesis letal debido a que los virus RNA replican normalmente con tasas de error cercanas al umbral de error (Crotty et al., 2001, Holland et al., 1990). La frecuencia de error en presencia de R de las poblaciones derivadas de pMT28-3D(3M) es 1,5 veces menor que la de pMT28 y esta leve diferencia puede contribuir a la resistencia a la extinción.

iii) El tratamiento de VFA con R conduce al aumento de las transiciones C \rightarrow U y G \rightarrow A en el espectro de mutantes de estas poblaciones (Airaksinen et al., 2003, Sierra et al., 2007). Este hecho se constata en las poblaciones derivadas de pMT28 tratadas con R, que muestran un aumento de transiciones C \rightarrow U y G \rightarrow A con respecto a la población control pMT28 no tratada con R (apartado 5.1.12.1 de Resultados). En el caso de las poblaciones derivadas de pMT28-3D(3M) tratadas con R, el patrón de transiciones no varía con respecto al de las poblaciones derivadas de pMT28-3D(3M) y pMT28 no tratadas con droga. En concreto, las poblaciones derivadas de pMT28 tratadas con R presentan un incremento significativo de media 4 veces

superior en el número de mutaciones de tipo C→U y G→A, con respecto a las poblaciones pMT28-3D(3M) tratadas con R (apartado 5.1.12.1 de Resultados). Este dato sugiere que 3D con la sustitución P44S, que tiene predilección por incorporar RMP frente a U en lugar de frente a C, podría influir en el patrón de transiciones, como se ha comentado en el apartado 6.6.1.

6.8 La proteína 2C está implicada en la resistencia de VFA a R

Probablemente, la resistencia a la extinción de pMT28-3D(3M) durante el tratamiento con 5000 μ M R permite la aparición de la mutación C5087U que codifica el cambio I248T en 2C. Los datos experimentales obtenidos en cultivos apoyan firmemente la implicación de esta mutación en la resistencia de VFA a R por las siguientes razones:

i) Es la única mutación observada en todo el genoma de pMT28-3D(3M) durante los pases en presencia de mutágeno. Además, su aparición en la secuencia consenso está emparejada con el aumento de infectividad que muestra el virus a partir del pase 7 (apartado 5.3.1 de Resultados).

ii) El virus pMT28-2C(I248T), que contiene la mutación C5087U en el contexto genético de pMT28, no se extingue en presencia de 5000 μ M R.

iii) El virus pMT28-3D(4M) [pMT28-3D(3M) con el cambio I248T en 2C] tiene *fitness* relativo 5 veces mayor que pMT28-3D(3M) en presencia de 5000 μ M R.

Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral han permitido indagar en los mecanismos por los cuales 2C media en la resistencia de VFA a R, teniendo en cuenta las funciones que se le asignan a esta proteína durante el ciclo infectivo del virus (apartado 2.7 de Introducción). El virus pMT28-2C(I248T) no se extingue en presencia de 5000 μ M R, aunque su espectro de mutantes muestra una frecuencia de mutación superior a la del virus pMT28, que sí se extingue (apartado 5.3.5 de Resultados). Al contrario de lo que ocurre en el caso de pMT28, el patrón de mutaciones del espectro de mutantes de pMT28-2C(I248T) es el mismo en presencia y en ausencia de R (apartado 5.3.5.1 de Resultados). Es posible, por tanto, que en el caso de VFA la extinción por mutagénesis letal se produzca más por verse alterado un patrón de transiciones balanceado, que por el simple hecho de aumentar la frecuencia de mutación. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral implican un papel activo de la proteína 2C, tanto en la regulación de la frecuencia de mutación del virus, como en el tipo de mutaciones acumuladas en el espectro de mutantes.

Los valores de la frecuencia de mutación ponen de manifiesto también una relación sinérgica entre 3D y 2C: la frecuencia de mutación del virus pMT28-3D(3M) es similar a la de pMT28-2C(I248T) en ausencia de R (4×10^{-4} y 5×10^{-4} , respectivamente) pero significativamente diferente en su presencia (13×10^{-4} y 24×10^{-4} , respectivamente). Sin embargo, la frecuencia de mutación de pMT28-2C(I248T) es significativamente mayor que la de pMT28-3D(4M) [pMT28-3D(3M) con el cambio I248T en 2C], tanto en ausencia como en presencia de R. Estos datos sugieren que en las poblaciones derivadas de pMT28-3D(3M) tratadas con la droga, el patrón de transiciones observado en el espectro de mutantes, como la frecuencia de mutación, están regulados tanto por 3D como por 2C. La aparición de la mutación C5087U es una prueba de la existencia de determinantes de resistencia de VFA a R fuera de la

región 3D. La frecuencia de mutación de pMT28-3D(4M) es también significativamente menor que la de pMT28, lo que le convierte en el primer caso conocido de VFA con frecuencia de mutación alterada.

La sustitución I248T en 2C de VFA ha aparecido anteriormente bajo diferentes presiones selectivas (apartado 2.7 de Introducción) por lo que es improbable que la mutación I248T haya surgido como respuesta específica frente a R. El valor de *fitness* de pMT28-3D(4M) con respecto a pMT28-3D(3M) en ausencia de R es 3 lo que indica que la mutación I248T aumenta la eficacia biológica de VFA de forma general, explicando por qué una misma mutación ha sido seleccionada bajo muy diversas presiones selectivas.

6.8.1 El análisis bioquímico de 2C confirma los resultados obtenidos en cultivos celulares

Debido al interés despertado por la aparición de la mutación en 2C, se ha decidido clonar, expresar y purificar la proteína recombinante 2C y 2C(I248T) para caracterizarlas bioquímicamente (apartado 5.4 de Resultados). Los datos obtenidos indican que 2C tiene actividad ATPasa y GTPasa (apartado 5.4.2 de Resultados) y capacidad de interacción con el RNA *in vitro* (apartado 5.4.3 de Resultados). Además, la interacción con el RNA modifica la afinidad por el nucleótido tanto para la proteína *wt* como para la proteína mutante.

El residuo I248 no está conservado en 2C de otros picornavirus y se encuentra fuera de las regiones propuestas de unión a RNA, interacción con membranas o motivos encargados en la actividad helicasa (apartado 2.7 de Introducción). Dado que no se conoce la estructura tridimensional de 2C de ningún picornavirus, es complicado asignar una función estructural al residuo I248. 2C(I248T) muestra una afinidad de 5-10 veces mayor que 2C *wt* por el ATP. Además, la presencia de RNA poli(U) estimula su actividad ATPasa en unas 20 veces, a diferencia de 2C *wt*, para la que no se observa estimulación por este RNA (apartado 5.4.4 de Resultados). Dado que el mantenimiento de la actividad ATPasa de 2C es indispensable para la viabilidad del virus (Mirzayan & Wimmer, 1994, Teterina et al., 1992), el aumento de afinidad por el sustrato y la estimulación de 2C(I248T) por RNA poli(U), pueden suponer una ventaja en determinados momentos del ciclo infeccioso del virus (este punto se discute en el apartado 6.8.3).

Como se indica en el apartado 6.8, la resistencia de VFA a la extinción por R mediada por 2C se debe probablemente a un aumento de eficacia biológica más que a una resistencia específica a la droga. Sin embargo, dado que R es un análogo de purinas, cabe la posibilidad de que RTP sea reconocido por 2C (ya sea como análogo de GTP o de ATP) en el interior de las células durante un tratamiento con R. Los resultados obtenidos indican que RTP inhibe competitivamente la actividad ATPasa de 2C *in vitro*. La $K_{i,app}$ de RTP para este ensayo es sólo 2,5 veces el valor de $K_{d,app}$ del ATP. Este valor es del mismo orden de magnitud que el valor de $K_{d,app}$ de RTP para la polimerización por 3D *in vitro* (Arias et al., 2008). Por tanto, si se asume que estos valores reflejan el comportamiento *in vivo* de estas enzimas, la concentración de RTP en el interior de la célula es suficiente para provocar tanto la incorporación incorrecta en el RNA por 3D como la inhibición de 2C. En este sentido, como muestra la **Figura 5.17** de

Resultados, 5000 μM R es capaz de inhibir la síntesis de RNA viral ~ 100 veces solamente 1 h después de la adsorción, indicando, por tanto, una inhibición producida por R *per se* independiente de su actividad mutagénica.

La mutación I248T fue aislada anteriormente en poblaciones de VFA resistentes a GuH (Pariente et al., 2003). GuH actúa como inhibidor de la replicación de distintos picornavirus (apartado 2.7 de Introducción). En nuestro laboratorio se ha determinado que 4-8 mM GuH es capaz de disminuir hasta 4 órdenes de magnitud la replicación de VFA, mientras que un virus con la mutación I248T en 2C no se ve afectado (Pariente et al., 2003). Los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral indican que GuH inhibe la actividad ATPasa de 2C, pero no la de 2C(I248T) *in vitro*, de acuerdo con los datos obtenidos en cultivos celulares (Pariente et al., 2003). Estos resultados son análogos a los observados con mutantes de 2C de PV que confieren resistencia a GuH en cultivos celulares (Pfister & Wimmer, 1999). Los datos experimentales indican que la inhibición ejercida por GuH es de tipo no competitivo (apartado 5.4.8 de Resultados). GuH podría actuar como un inhibidor alostérico que mimetizara un regulador natural de la actividad ATPasa de 2C, por unión a un sitio en la proteína que indujera un cambio conformacional. Es posible que el efecto ejercido por GuH en la actividad de 2C no sea universal, como lo sugiere, tanto la aparición de mutaciones de resistencia a GuH en diversos motivos dentro de la proteína (**Figura 2.11** de Introducción), como la existencia de mutantes de PV cuya viabilidad es dependiente de GuH (Pincus et al., 1986, Pincus et al., 1987).

6.8.2 Posible mecanismo de acción de 2C

Como se indica en el apartado 2.7 de Introducción, a la proteína 2C se le han asignado varias funciones durante el ciclo replicativo del virus. Sin embargo, los mecanismos bioquímicos implicados son desconocidos. Se sabe que el mantenimiento de la actividad ATPasa de 2C es necesario para la viabilidad del virus (Mirzayan & Wimmer, 1994, Teterina et al., 1992) pero no se conoce a qué proceso biológico está acoplada. Recientemente se ha propuesto que 2C podría actuar como chaperona que mediaría en la formación de complejos funcionales de ribonucleoproteína (RNP) con elementos en *cis* regulatorios de RNA (Steil & Barton, 2009). Esta función sería similar a la actividad chaperona de RNP necesaria para el ensamblaje de los complejos ribonucleoproteicos involucrados en el *splicing* del RNA (Pellizzoni y cols. 2002). Dreyfuss y cols. muestran que los complejos snRNP (ribonucleoproteínas pequeñas nucleares) necesitan la actividad ATPasa de unos complejos proteicos (complejos SMN) para su correcto ensamblaje en el interior celular (Pellizzoni et al., 2002). snRNP pueden auto ensamblarse inapropiadamente *in vitro* con RNAs ricos en poli(U) diferentes a los snRNAs (RNAs pequeños nucleares), conduciendo a la formación de RNPs no funcionales. La actividad ATPasa de determinadas subunidades del complejo SMN permite dirigir el ensamblaje correcto entre snRNA y proteínas para formar snRNPs funcionales (Baccon et al., 2002, Gubitz et al., 2002, Pellizzoni et al., 2002). Así, los complejos SMN, a través de la actividad ATPasa, funcionan como chaperonas de RNPs.

En el caso de PV, 2C podría actuar como chaperona de RNP en los complejos de replicación asociados a membrana, coordinando el correcto ensamblaje de los complejos

ribonucleoproteicos formados con los elementos 5' UTR, OriI y 3' UTR en el momento oportuno y con los componentes apropiados (Steil & Barton, 2009). Aunque *in vitro* es posible producir la uridilación de VPg por 3D en ausencia de 2C (Agudo et al., 2008, Arias et al., 2005, Paul et al., 2000) en la replicación de PV, la uridilación de VPg requiere la integridad del extremo UTR 5' y la actividad ATPasa de 2C. Así, la actividad ATPasa de 2C es necesaria para el proceso de replicación de RNA incluyendo la uridilación dependiente de OriI, la cual requiere la actuación *in cis* de elementos de RNA distales (Barton & Flanagan, 1997, Barton et al., 2001, Lyons et al., 2001, Morasco et al., 2003, Murray & Barton, 2003). 2C puede actuar previniendo la formación de complejos de RNPs no funcionales en los complejos de replicación de manera análoga a las subunidades con actividad ATPasa de los complejos SMN. El estudio realizado con el antígeno T del virus de simio 40 (SV40) (único miembro de la superfamilia 3 de helicasas, con actividad ATPasa y helicasa demostrada), que está involucrado en la formación de los complejos de RNPs en el origen de replicación de SV40, puede proporcionar pistas acerca la regulación de la formación de RNPs asociadas con la replicación viral en picornavirus (Li et al., 2003, Meinke et al., 2006, Wang et al., 2007).

6.8.3 Posibles causas del origen de la sustitución I248T en 2C

Teniendo en cuenta el mecanismo de acción de 2C expuesto y los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral, inmediatamente se nos plantean 2 preguntas: por qué ha surgido la mutación I248T en 2C de VFA bajo presiones selectivas tan diferentes y de qué manera 2C es capaz de regular la cantidad y tipo de mutaciones acumuladas en el genoma.

El RNA poli(A) estimula ~5 veces la actividad ATPasa de 2C *wt* y 2C(I248T), mientras que el RNA poli(U) estimula ~20 veces la actividad ATPasa de 2C(I248T) (apartado 5.4.4). Además el virus pMT28-2C(I248T) tiene, de media, una cantidad de RNA ~4 veces superior a pMT28, aunque el título viral es similar en ambos virus (**Figura 6.3**). Dado que GuH es una droga que inhibe el inicio de la replicación viral durante la síntesis de la cadena negativa (Barton & Flanagan, 1997, Teterina et al., 2001) y que I248T también se selecciona en presencia de GuH (Pariente et al., 2003), una posible causa de la aparición de este cambio es que permita una regulación más eficiente de la replicación de la cadena negativa de RNA. Durante el inicio de la síntesis de cadena negativa, ha de formarse un complejo de RNPs competente entre el extremo 5' de la cadena naciente y el UTR 3' de la cadena molde. Este extremo presenta un largo tramo de poli(A) (apartado 2.3.2.1 de Introducción) que ha de ser reconocido por la maquinaria de replicación viral de manera apropiada para garantizar la viabilidad del proceso de replicación. En esta situación, 2C, mediante su actividad ATPasa, puede ser la encargada de organizar los complejos de RNPs competentes evitando la hibridación de poli(A) con RNAs celulares con tramo de poli(U), o incluso la formación de complejos de iniciación erróneos junto al poli(U) en el extremo 5' de la cadena negativa del virus que darían lugar a una replicación abortiva.

GuH es capaz de inhibir la actividad ATPasa de 2C, impidiendo el inicio de la replicación de la cadena negativa de RNA. Sin embargo, I248T en 2C es capaz de restaurar la actividad ATPasa en presencia GuH y de estimular la capacidad ATPasa en presencia

precisamente de tramos largos de poli(U). Datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio parecen indicar que 2C(I248T) podría tener actividad chaperona de RNA capaz de permitir la formación de complejos estables de heteroduplex poli(A)-poli(U) mucho más rápidamente que 2C *wt*. 2C(I248T) podría permitir un incremento de la síntesis de RNA de cadena negativa debido a la facilidad de formar complejos de RNPs funcionales en replicación, aumentando la procesividad de la polimerasa 3D. Este proceso conduciría al incremento de la cantidad de RNA viral del virus mutante con respecto al virus *wt* (**Figura 6.3**).

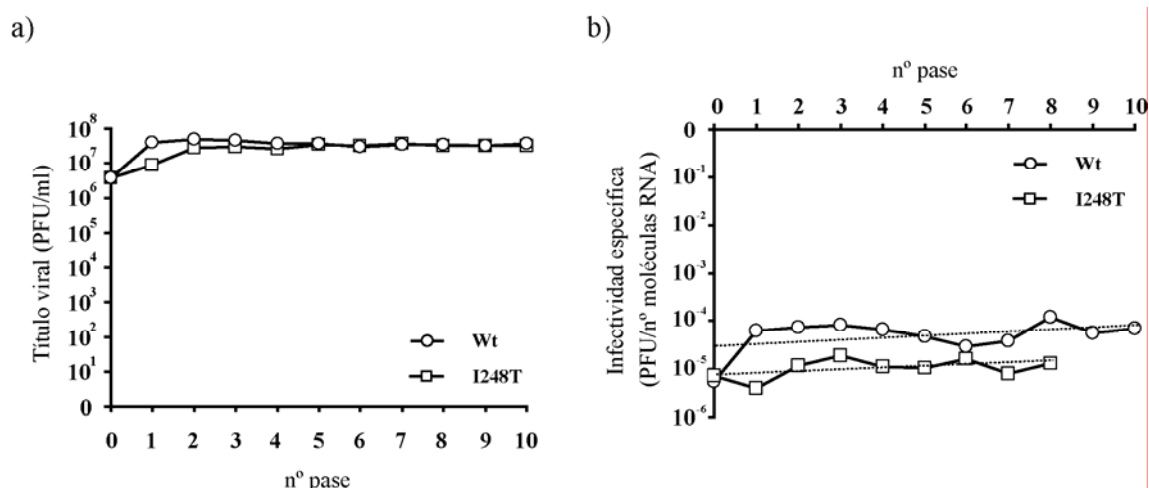


Figura 6.3 Título viral e infectividad específica de las poblaciones virales derivadas de pMT28 y pMT28-2C(I248T). Comparación del título viral (tomado de los apartados 5.1.10 y 5.3.3 de Resultados) a), e infectividad específica (tomado de las **Figuras 5.19 y 5.20** de Resultados) b), de las poblaciones virales derivadas de la infección en células BHK-21 de pMT28 (círculos blancos) y pMT28-2C(I248T) (cuadrados blancos), respectivamente. Se muestra en línea discontinua la recta de tendencia de infectividad específica a lo largo de los pases de pMT28 ($y = 2,8 \times 10^{-5} e^{0,11x}$) y pMT28-2C(I248T) ($y = 0,7 \times 10^{-5} e^{0,08x}$).

Durante la replicación, se genera una forma replicativa (FR) de doble banda a partir de la cual se genera una cadena nueva de RNA de polaridad negativa que puede servir simultáneamente como molde de la síntesis de varias cadenas de polaridad positiva formando un complejo denominado intermediario replicativo (IR) (Wimmer et al., 1993). Durante este proceso, 2C podría estabilizar estructuras secundarias entre la cadena molde y la cadena naciente cerca del sitio de polimerización para garantizar la correcta síntesis del RNA. En estas condiciones, 2C podría estar interaccionando (directa o indirectamente, a través de otros elementos) con la polimerasa, de tal modo que afectase tanto la frecuencia como el tipo de mutaciones introducidas por 3D durante la síntesis. La contribución de proteínas accesorias en la modulación de la fidelidad durante la síntesis del DNA ha sido ampliamente estudiada (Chaudhuri et al., 2003, Chen et al., 1999, Perales et al., 2003, Zhong et al., 2006). El factor de procesividad de la polimerasa pol δ estimula específicamente ~27 veces la elongación incorrecta del par G-T en ensayos de extensión de cebador *in vitro* (Mozzherin et al., 1996). Se ha observado que mutaciones en el factor de procesividad gp45 y la proteína de unión a DNA de

cadena sencilla gp32 producen conjuntamente un aumento de 1,6 veces en la frecuencia de mutación de la polimerasa de DNA del bacteriofago RB69, incrementando las transiciones T→C y disminuyendo las transversiones G→A con respecto a los valores obtenidos con proteínas *wt* (Bebenek et al., 2005). 2C podría actuar de manera similar durante la síntesis del RNA de VFA, modulando el tipo y frecuencia de las mutaciones introducidas por 3D durante la replicación: las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T) muestran una diferencia en frecuencia de mutación con respecto a pMT28-3D(3M) en presencia de R (población R-I248Tp4 comparado con R-3Mp4, apartado 5.3.5 de Resultados). A pesar de ello, las transiciones mayoritarias en ambas poblaciones en presencia de R son U→C y A→G mientras que para pMT28 son C→U y G→A. La sustitución I248T en 2C, por tanto, alteraría tanto la frecuencia como el tipo de mutaciones producidas por 3D respecto al virus pMT28, aumentando las transiciones de tipo U→C y A→G en presencia del mutágeno.

La forma en que estas proteínas alteran la función de polimerasa no está clara. Se ha postulado que las proteínas de unión a DNA de banda simple de *E.coli* podrían promover un aumento de fidelidad durante la polimerización aumentando la rigidez del DNA molde, incrementando de este modo el impedimento estérico entre el molde y el nucleótido incorrecto (Kunkel et al., 1979). De este modo, los apareamientos distintos a los de tipo Watson-Crick serían discriminados durante la síntesis del material genético. En presencia de R, RMP se incorpora en las cadenas nacientes de RNA, de forma que los apareamientos de RNA producidos en el RF y RI pueden volverse más lábiles (por ejemplo RMP forma 2 puentes de hidrógeno con C en lugar de los 3 que formaría GMP; **Figura 2.18** de Introducción). En estas condiciones 2C(I248T), gracias a su actividad incrementada, reconocería estas estructuras como extrañas más que 2C *wt*, provocando la desestabilización de determinados puntos del RNA durante la formación de los complejos replicativos RF o RI. Estas variaciones repentinas en la topología del RNA podrían provocar un aumento en la frecuencia de mutación (estimulada por la presencia de R), y en el tipo de mutaciones observado en el espectro de mutantes de las poblaciones derivadas de pMT28-2C(I248T). Sin embargo, en el caso de pMT28-3D(3M), la polimerasa 3D(3M) incorporaría menos RMP durante la replicación (apartado 5.2.4.2 de Resultados), mientras que en pMT28-3D(4M), además, 2C(I248T) estimularía la formación de complejos competentes de replicación con respecto a 2C *wt*. La suma de estos procesos aumentaría la estabilidad tanto de RF como de RI, favoreciendo una disminución en la frecuencia de mutación observada.

Por tanto, mediante mutaciones en proteínas diferentes (I248T en 2C, y P44S, P169S y M296I en 3D) se obtiene el mismo efecto fenotípico: el mantenimiento de un apropiado patrón de transiciones necesario para la viabilidad del virus (apartado 6.7). Estudios encaminados a medir la síntesis de RNA viral intracelular, o la proporción de cadenas negativas y positivas de RNA del virus pMT28-2C(I248T) con respecto a pMT28, así como ensayos *in vitro* en presencia o ausencia de 3D que permitan caracterizar la actividad bioquímica de 2C pueden ser muy valiosos para dilucidar el efecto concreto de la mutación I248T en 2C durante la replicación del genoma de VFA.

6.9 Los datos bioquímicos explican la acción antiviral ejercida por 5-fluorouracilo para VFA en cultivos celulares

5-fluorouracilo (FU) es un análogo de pirimidina ampliamente usado en terapia antitumoral cuya función antiviral a través de mutagénesis letal ha sido estudiada tanto en ensayos en cultivos celulares (Grande-Perez et al., 2005, Grande-Pérez et al., 2002, Holland et al., 1990, Pariente et al., 2003, Pariente et al., 2001, Sierra et al., 2000) como *in vivo* (Ruiz-Jarabo et al., 2003). Los estudios realizados con VFA revelaron que FU ejercía una acción inhibitoria y mutagénica durante la replicación del virus (Pariente et al., 2003, Sierra et al., 2000). Ambos efectos probablemente contribuyen a la extinción mediada por mutagénesis letal, ya que una bajada en la carga viral favorece la extinción (Sierra et al., 2000). Sin embargo, la inhibición ejercida por FU no es suficiente para explicar la extinción, ya que una actividad inhibitoria equivalente ejercida por otros agentes antivirales sin actividad mutagénica, no condujo a la extinción de VFA (Pariente et al., 2003).

En la presente Tesis Doctoral, se ha usado la polimerasa 3D de VFA para caracterizar la actividad inhibitoria y mutagénica ejercida por FU durante la replicación viral. La inhibición de la uridilación de la VPg por FUTP se ha documentado tanto en presencia de Mn^{2+} y poli(A), como en presencia de *cre*, 3CD y Mg^{2+} . Ya que Mn^{2+} puede afectar la actividad y fidelidad de las polimerasas (Arnold et al., 1999, Beckman et al., 1985, Crotty et al., 2003, Frank & Woodgate, 2007) se ha verificado que la actividad inhibitoria ejercida por FUTP no es dependiente de la presencia de Mn^{2+} . La obtención de un complejo formado por FUMP unido covalentemente a Tyr-3 de VPg indica que 3D cataliza la fluorouridilación de VPg, previniendo la incorporación de residuos de UMP [Figuras 5.36(a) y 5.40 de Resultados]. Las bases moleculares de este bloqueo son desconocidas, y sería necesario comparar las estructuras de los complejos FUMP-VPg-3D con respecto los complejos UMP-VPg-3D ya descritos (Ferrer-Orta et al., 2006a) para proponer un posible mecanismo para explicar la inhibición observada.

En contraste con la fuerte inhibición ejercida por FUTP en la uridilación de VPg durante el inicio de la replicación de VFA, el FUMP es efectivamente incorporado por 3D de VFA y permite la elongación del RNA tras su incorporación. De acuerdo con esta conclusión, el grupo de la Dra. Nuria Verdaguer ha conseguido obtener un complejo 3D-RNA donde se incorpora FUMP en la posición +1 del iniciador y se produce la adecuada translocación del RNA para que pueda incorporarse un nuevo nucleótido. Los resultados obtenidos con 3D purificada *in vitro* son consistentes con las observaciones en cultivos celulares (Grande-Perez et al., 2005, Sierra et al., 2000): la incorporación de FUMP es más eficiente frente a A que frente a G en el molde (Figuras 5.41 de Resultados). Este tipo de apareamientos está de acuerdo con la dominancia de de transiciones A→G y U→C observada en las poblaciones de VFA sometidas a replicación en presencia de FU (Grande-Perez et al., 2005, Sierra et al., 2000). El FU no actúa como terminador de cadena, permitiendo la elongación de productos donde se ha incorporado FU (Figura 5.42 de Resultados). Finalmente, la incorporación incorrecta de GMP frente a FUMP en el molde es 17 veces más rápida que frente a UMP (Figura 5.45 de Resultados). Durante al tratamiento con FU, se genera FUTP en las células mientras que disminuyen los niveles de UTP (Pariente et al., 2003). En este ambiente, la incorporación de FUTP frente a A puede estar

favorecida durante la replicación de VFA, conduciendo al incremento en la frecuencia de transiciones A→G (apartado 2.8.1.2.1 de Introducción).

Los niveles intracelulares de UTP y FUTP en las células BHK-21 se han estimado en 9 y 25 fmol/célula respectivamente (Pariente et al., 2003). Asumiendo un volumen de 3,9 pl por célula (Griffiths et al., 1984), estos niveles corresponden a 2,3 mM UTP y 6,4 mM FUTP respectivamente. La concentración de FUTP es 3 veces mayor que la concentración de UTP y 3 órdenes de magnitud mayor que el valor de $K_{i,app}$ de FUTP para la uridilación de VPg (**Figura 5.38 y 5.39** de Resultados). Así el FUTP puede ejercer la acción mutagénica e inhibitoria durante la síntesis de RNA de VFA, asumiendo que su concentración en el complejo de replicación es comparable a la estimada para el total de la célula (Pastor-Anglada et al., 2005).

No se ha observado inhibición de FUTP en los ensayos de polimerización, ni siquiera en aquellos realizados utilizando poli(A) y Mn^{2+} , bajo condiciones idénticas a las utilizadas en los ensayos de uridilación de VPg. Este resultado sugiere una separación funcional en la polimerasa de VFA entre el inicio de la replicación (uridilación de VPg) y la elongación del RNA. Esta posible separación de funciones está apoyada por un reciente estudio realizado en poliovirus, en donde se ha observado que un mutante de polimerasa de fidelidad alterada (cambio N297E en 3D) muestra un defecto 5 veces mayor en la uridilación de VPg que en la síntesis de RNA (Korneeva & Cameron, 2007). La identificación de la uridilación de VPg como una diana de la actividad inhibitoria de FUTP no excluye que otros pasos durante la infección de VFA estén también afectados por la droga, o que la alteración en el metabolismo de pirimidinas producido por la adición de FU pueda afectar la replicación de VFA.

6.10 Perspectivas y futuro de la catástrofe de error como estrategia antiviral

En conjunto, el empleo de agentes mutagénicos se presenta como una nueva y prometedora estrategia antiviral documentada con varios sistemas virales tanto en cultivos celulares como *in vivo* [(Crotty et al., 2001, Eigen, 2002, Graci et al., 2007, Grande-Pérez et al., 2002, Harris et al., 2005, Loeb et al., 1999, Ruiz-Jarabo et al., 2003, Sierra et al., 2000); revisado en (Anderson et al., 2004, Domingo, 2006)]. No obstante, su aplicación práctica requerirá encontrar agentes mutagénicos adecuados, no tóxicos y específicos para las replicasas virales. A pesar de que R está aprobada para terapia de diversas infecciones [notablemente en el virus de la hepatitis C (VHC) y algunos virus respiratorios y hemorrágicos], el tratamiento ocasiona a menudo efectos secundarios negativos y muestra eficacia limitada (aproximadamente, el 50% de pacientes de VHC tratados con R en combinación con interferon- α muestran una respuesta mantenida) (Feld & Hoofnagle, 2005). Una alternativa en estudio es el diseño de análogos de R y nucleótidos de nueva generación (mediante pequeñas variaciones en su estructura) que muestren un mejor perfil farmacocinético que permita alcanzar concentraciones más altas de drogas en el sitio de infección, evitando efectos secundarios (Graci & Cameron, 2004, Graci et al., 2007, Graci et al., 2008, Harki et al., 2007, Harki et al., 2006, Hong & Cameron, 2002, Moriyama et al., 2008). De hecho, las concentraciones de R alcanzadas en pacientes se encuentran aproximadamente entre el 0,2 y el 10% de las concentraciones que

han resultado efectivas para la extinción de VFA de células en cultivo (Airaksinen et al., 2003). El empleo de la mutagénesis letal como estrategia antiviral no estaría restringido al uso de análogos de nucleótido. El descubrimiento de residuos lejanos al bolsillo de unión a ribosa, como P44S ó M296I, que puedan modular la fidelidad de una enzima, permite contemplar el diseño de nuevas drogas que se unan a la superficie de las replicasas virales y que alteren la fidelidad de la enzima, reduciendo los problemas de toxicidad celular. Inhibidores que se unen a la superficie de enzimas y que afectan a su actividad catalítica por interacciones indirectas han mostrado efectividad en algunas RNA polimerasas, como en el caso *E. coli* (Artsimovitch et al., 2003). Será importante investigar posibles alteraciones de la fidelidad de las polimerasas víricas por ligandos alejados del centro activo.

El estudio enzimológico realizado en esta Tesis Doctoral proporciona una interpretación de la extinción de VFA por mutagénesis letal mediada tanto por R como por FU. Estos resultados apoyan el desarrollo de nuevos análogos de nucleótido que puedan ejercer varias actividades antivirales sin alterar el metabolismo celular. Este diseño parece factible debido al hecho de que en varios pasos durante la replicación del virus, además del propio proceso de elongación del RNA, los nucleótidos pueden estar involucrados como cofactores que interaccionen con proteínas virales para que estas puedan desarrollar su función, apoyando la idea de que la resistencia del virus a los análogos de nucleósidos puede estar mediada por otras proteínas, además de por la polimerasa viral (apartado 6.8). En relación con esta idea, en un estudio realizado con el replicón de VHC, se observó que mutaciones en la proteína no estructural NS5A eran suficientes para conferir al virus resistencia a R (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005). Al igual que 2C en el caso de VFA, NS5A es una proteína multifuncional esencial durante la replicación de VHC. NS5A es capaz de interaccionar con la polimerasa viral, NS5B, y unir RNA entre otras diversas funciones (Huang et al., 2005, Masaki et al., 2008, Shimakami et al., 2004, Shiota et al., 2002). En concreto, los datos apartados por esta Tesis Doctoral indican que junto con la polimerasa, otros productos génicos de VFA pueden ser diana terapéutica de los análogos de nucleótido.

7. Conclusiones

7 Conclusiones

1. La replicación del virus de la fiebre aftosa (VFA) en presencia de ribavirina (R) provoca la selección de mutantes con las sustituciones P44S, P169S y M296I en la polimerasa (3D). Estas sustituciones confieren una ventaja selectiva durante la replicación del virus en presencia del mutágeno pero no en su ausencia.
2. VFA se extingue durante un tratamiento a lo largo de los pases en presencia de 5000 μ M R. Sin embargo, el mutante con los cambios P44S, P169S y M296I en 3D [pMT28-3D(3M)] es resistente a la extinción por el mutágeno.
3. Las polimerasas con mutaciones originadas tras el tratamiento con R tienen un defecto en la incorporación de ribavirina-5'-monofosfato (RMP) frente a CMP o UMP en el molde de RNA en ensayos *in vitro*. Los mutantes de polimerasa con la mutación P44S, sola o acompañada de otras, presenta un defecto específico en la incorporación de RMP frente a CMP.
4. Durante los pases de pMT28-3D(3M) en presencia de 5000 μ M R se impone la sustitución I248T en la proteína 2C. Los virus con esta mutación en 2C tienen menor sensibilidad a R. En el contexto de pMT28-3D(3M), esta sustitución aumenta la eficacia biológica del virus tanto en presencia como en ausencia de R.
5. Se han expresado y purificado las proteínas 2C de VFA de tipo salvaje (*wt*) y mutante con I248T. Se han puesto a punto ensayos de actividad NTPasa de 2C, en presencia y ausencia de RNA monopoliméricos. La actividad NTPasa de 2C *wt in vitro* se estimula por RNA poli(A) y se inhibe por ribavirina-5'-trifosfato (RTP) e hidrocloreuro de guanidinio (GuH). La actividad NTPasa de 2C(I248T) se estimula tanto por RNA poli(A) como por RNA poli(U). I248T reduce la inhibición de la actividad NTPasa por RTP y GuH.
6. FUTP inhibe competitivamente *in vitro* la uridilación de VPg por 3D, mediante la unión covalente de FUMP al sitio de unión de UMP.
7. FUMP es incorporado por 3D durante la síntesis del RNA más eficientemente frente a AMP que frente a GMP. Su incorporación en el RNA no produce la terminación de cadena y permite que la síntesis continúe.
8. Cuando está presente en el molde, FUMP dirige la incorporación tanto de AMP como de GMP. GMP se incorpora 17 veces más rápido frente a FUMP que frente a UMP.

8. Bibliografía

8 Bibliografía

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. & Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**, 709-716.
- Agol, V. I. (2006). Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**, 211-59.
- Agudo, R., Arias, A., Pariente, N., Perales, C., Escarmis, C., Jorge, A., Marina, A. & Domingo, E. (2008). Molecular characterization of a dual inhibitory and mutagenic activity of 5-fluorouridine triphosphate on viral RNA synthesis. Implications for lethal mutagenesis. *J Mol Biol* **382**, 652-66.
- Aherne, G. W., Hardcastle, A., Raynaud, F. & Jackman, A. L. (1996). Immunoreactive dUMP and TTP pools as an index of thymidylate synthase inhibition; effect of tomudex (ZD1694) and a nonpolyglutamated quinazoline antifolate (CB30900) in L1210 mouse leukaemia cells. *Biochem Pharmacol* **51**, 1293-301.
- Ahmed, R., Hahn, C. S., Somasundaram, T., Villarete, L., Matloubian, M. & Strauss, J. H. (1991). Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J Virol* **65**, 4242-7.
- Airaksinen, A., Pariente, N., Menendez-Arias, L. & Domingo, E. (2003). Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**, 339-49.
- Alba, M. (2001). Replicative DNA polymerases. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3002.
- Aldabe, R. & Carrasco, L. (1995). Induction of membrane proliferation by poliovirus proteins 2C and 2BC. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 64-76.
- Amaraa, R., Mareckova, H., Urbanek, P. & Fucikova, T. (2003). Immunological predictors of different responses to combination therapy with interferon alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* **38**, 254-9.
- Amero, C. D., Arnold, J. J., Moustafa, I. M., Cameron, C. E. & Foster, M. P. (2008). Identification of the oril-binding site of poliovirus 3C protein by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Virol* **82**, 4363-70.
- Anderson, J. P., Daifuku, R. & Loeb, L. A. (2004). Viral Error Catastrophe by Mutagenic Nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 183-205.
- Andrei, G. & De Clercq, E. (1993). Molecular approaches for the treatment of hemorrhagic fever virus infections. *Antiviral Res* **22**, 45-75.
- Arias, A., Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Perez-Luque, R., Airaksinen, A., Brocchi, E., Domingo, E., Verdaguer, N. & Escarmis, C. (2005). Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J. Mol. Biol.* **353**, 1021-32.
- Arias, A., Arnold, J. J., Sierra, M., Smidansky, E. D., Domingo, E. & Cameron, C. E. (2008). Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (in)fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol* **82**, 12346-55.
- Arias, A., Lázaro, E., Escarmís, C. & Domingo, E. (2001). Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *J. Gen. Virol.* **82**, 1049-60.
- Arias, A., Ruiz-Jarabo, C. M., Escarmis, C. & Domingo, E. (2004). Fitness increase of memory genomes in a viral quasispecies. *J. Mol. Biol.* **339**, 405-12.
- Arnold, J. J. & Cameron, C. E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D^{pol}). Assembly of stable, elongation-competent complexes by using a symmetrical primer-template substrate (sym/sub). *J. Biol. Chem.* **275**, 5329-36.
- Arnold, J. J., Ghosh, S. K. & Cameron, C. E. (1999). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection. *J. Biol. Chem.* **274**, 37060-9.

- Arnold, J. J., Vignuzzi, M., Stone, J. K., Andino, R. & Cameron, C. E. (2005). Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **280**, 25706-16.
- Artsimovitch, I., Chu, C., Lynch, A. S. & Landick, R. (2003). A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition. *Science* **302**, 650-4.
- Asahina, Y., Izumi, N., Enomoto, N., Uchihara, M., Kurosaki, M., Onuki, Y., Nishimura, Y., Ueda, K., Tsuchiya, K., Nakanishi, H., Kitamura, T. & Miyake, S. (2005). Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **43**, 623-9.
- Baccon, J., Pellizzoni, L., Rappsilber, J., Mann, M. & Dreyfuss, G. (2002). Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem* **277**, 31957-62.
- Bae, Y. S. & Yoon, J. W. (1993). Determination of diabetogenicity attributable to a single amino acid, Ala776, on the polyprotein of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* **42**, 435-43.
- Baltera, R. F., Jr. & Tershak, D. R. (1989). Guanidine-resistant mutants of poliovirus have distinct mutations in peptide 2C. *J. Virol.* **63**, 4441-4.
- Balzarini, J., Karlsson, A., Wang, L., Bohman, C., Horska, K., Votruba, I., Fridland, A., Van Aerschot, A., Herdewijn, P. & De Clercq, E. (1993). Eicar (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *J Biol Chem* **268**, 24591-8.
- Banerjee, R. & Dasgupta, A. (2001). Interaction of picornavirus 2C polypeptide with the viral negative-strand RNA. *J Gen Virol* **82**, 2621-7.
- Banerjee, R., Echeverri, A. & Dasgupta, A. (1997). Poliovirus-encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative-strand RNA. *J Virol* **71**, 9570-8.
- Banerjee, R., Weidman, M. K., Echeverri, A., Kundu, P. & Dasgupta, A. (2004). Regulation of poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide. *J Virol* **78**, 9243-56.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M. & Domingo, E. (2001). Evolution of cell recognition by viruses. *Science* **292**, 1102-5.
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Verdaguer, N. & Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv. Virus Res.* **62**, 19-111.
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E. & Domingo, E. (2000). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J. Virol.* **74**, 1641-7.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Beck, E. & Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**, 6362-72.
- Barton, D. J. & Flanagan, J. B. (1997). Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *J Virol* **71**, 8482-9.
- Barton, D. J., O'Donnell, B. J. & Flanagan, J. B. (2001). 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *Embo J* **20**, 1439-48.
- Bartzatt, R. & Anderson, G. A. (1989). Ribavirin inhibits proliferation of bovine respiratory syncytial virus in vitro. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **12**, 57-62.
- Batschelet, E., Domingo, E. & Weissmann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* **1**, 27-32.
- Baxt, B. & Rieder, E. (2004). Molecular aspects of foot-and-mouth disease virus virulence and host range: Role of host cell receptors and viral factors. In *Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives*, pp. 145-172. Edited by F. Sobrino & E. Domingo. Wymondham: Horizon Bioscience.
- Beard, C. W. & Mason, P. W. (2000). Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **74**, 987-91.

- Beard, W. A. & Wilson, S. H. (2003). Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure* **11**, 489-96.
- Bebenek, A., Carver, G. T., Kadyrov, F. A., Kissling, G. E. & Drake, J. W. (2005). Processivity clamp gp45 and ssDNA-binding-protein gp32 modulate the fidelity of bacteriophage RB69 DNA polymerase in a sequence-specific manner, sometimes enhancing and sometimes compromising accuracy. *Genetics* **169**, 1815-24.
- Beckman, R. A., Mildvan, A. S. & Loeb, L. A. (1985). On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry* **24**, 5810-7.
- Bedard, K. M. & Semler, B. L. (2004). Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect* **6**, 702-13.
- Belsham, G. J. (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **60**, 241-260.
- Belsham, G. J. & Martínez-Salas, E. (2004). Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus RNA. In *Foot-and-mouth disease: current perspectives*, pp. 19-52. Edited by F. Sobrino & E. Domingo. Wymondham, England: Horizon Bioscience.
- Belsham, G. J., McInerney, G. M. & Ross-Smith, N. (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* **74**, 272-80.
- Belsham, G. J. & Normann, P. (2008). Dynamics of picornavirus RNA replication within infected cells. *J Gen Virol* **89**, 485-93.
- Belsham, G. J. & Sonenberg, N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* **60**, 499-511.
- Benarroch, D., Egloff, M. P., Mulard, L., Guerreiro, C., Romette, J. L. & Canard, B. (2004). A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *J Biol Chem* **279**, 35638-43.
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P. W. & Baxt, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v \beta_3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.* **69**, 2664-2666.
- Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G. & Salas, M. (1989). A conserved 3'→5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* **59**, 219-28.
- Biebricher, C. K. & Eigen, M. (2005). The error threshold. *Virus Res.* **107**, 117-27.
- Biebricher, C. K. & Eigen, M. (2006). What is a quasispecies? *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* **299**, 1-31.
- Bienz, K., Egger, D. & Pasamontes, L. (1987). Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* **160**, 220-6.
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T. & Troxler, M. (1992). Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol* **66**, 2740-7.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M. & Pasamontes, L. (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* **64**, 1156-63.
- Borrego, B., Camarero, J. A., Mateu, M. G. & Domingo, E. (1995). A highly divergent antigenic site of foot-and-mouth disease virus retains its immunodominance. *Viral Immunol* **8**, 11-18.
- Borrego, B., Novella, I. S., Giral, E., Andreu, D. & Domingo, E. (1993). Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J. Virol.* **67**, 6071-6079.
- Borrow, P., Evans, C. F. & Oldstone, M. B. (1995). Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. *J. Virol.* **69**, 1059-70.

- Bougie, I. & Bisaillon, M. (2004). The broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin as a substrate for a viral RNA capping enzyme. *J Biol Chem* **279**, 22124-30.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R. & Rey, F. A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13034-9.
- Brown, C. C. (2004). Stepping stones in foot-and-mouth disease research: a personal view. In *Foot-and-mouth disease: current perspectives*, pp. 1-18. Edited by F. Sobrino & E. Domingo. Wymondham, England: Horizon Bioscience.
- Bruenn, J. A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1821-9.
- Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H. & Stuart, D. I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* **410**, 235-40.
- Cao, W., Henry, M. D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J. H., Ravkov, E. V., Nichol, S. T., Compans, R. W., Campbell, K. P. & Oldstone, M. B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**, 2079-81.
- Caplen, H., Peters, C. J. & Bishop, D. H. (1985). Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development. *J. Gen. Virol.* **66**, 2271-7.
- Carrico, C. K. & Glazer, R. I. (1979). Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver. *Cancer Res* **39**, 3694-701.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2005). Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **79**, 6487-504.
- Cassidy, L. F. & Patterson, J. L. (1989). Mechanism of La Crosse virus inhibition by ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 2009-11.
- Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**, 483-489.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Contreras, A. M., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E. V. & Chung, R. T. (2002). Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J. Virol.* **76**, 8505-17.
- Cooper, A. C., Banasiak, N. C. & Allen, P. J. (2003). Management and prevention strategies for respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in infants and young children: a review of evidence-based practice interventions. *Pediatr Nurs* **29**, 452-6.
- Cooper, P. D. (1964). The Mutation of Poliovirus by 5-Fluorouracil. *Virology* **22**, 186-92.
- Cramp, M. E., Rossol, S., Chokshi, S., Carucci, P., Williams, R. & Naoumov, N. V. (2000). Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **118**, 346-55.
- Crance, J. M., Gratier, D., Guimet, J. & Jouan, A. (1997). Inhibition of sandfly fever Sicilian virus (Phlebovirus) replication in vitro by antiviral compounds. *Res Virol* **148**, 353-65.
- Crance, J. M., Scaramozzino, N., Jouan, A. & Garin, D. (2003). Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res* **58**, 73-9.
- Crotty, S., Cameron, C. E. & Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6895-900.
- Crotty, S., Gohara, D., Gilligan, D. K., Karelsky, S., Cameron, C. E. & Andino, R. (2003). Manganese-dependent polioviruses caused by mutations within the viral polymerase. *J Virol* **77**, 5378-88.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y. N., Hong, Z., Andino, R. & Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* **6**, 1375-1379.
- Cummings, K. J., Lee, S. M., West, E. S., Cid-Ruzafa, J., Fein, S. G., Aoki, Y., Sulkowski, M. S. & Goodman, S. N. (2001). Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-

- treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: A meta-analysis of randomized trials. *Jama* **285**, 193-9.
- Champe, S. P. & Benzer, S. (1962). Reversal of mutant phenotypes by 5-fluorouracil: an approach to nucleotide sequences in messenger-RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 532-46.
- Chang, J., Nie, X., Gudima, S. & Taylor, J. (2006). Action of inhibitors on accumulation of processed hepatitis delta virus RNAs. *J Virol* **80**, 3205-14.
- Chao, L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**, 454-455.
- Charpentier, N., Dávila, M., Domingo, E. & Escarmís, C. (1996). Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* **223**, 10-18.
- Chaudhuri, M., Song, L. & Parris, D. S. (2003). The herpes simplex virus type 1 DNA polymerase processivity factor increases fidelity without altering pre-steady-state rate constants for polymerization or excision. *J Biol Chem* **278**, 8996-9004.
- Chen, C., Merrill, B. J., Lau, P. J., Holm, C. & Kolodner, R. D. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* pol30 (proliferating cell nuclear antigen) mutations impair replication fidelity and mismatch repair. *Mol Cell Biol* **19**, 7801-15.
- Chevaliez, S., Brillet, R., Lazaro, E., Hezode, C. & Pawlotsky, J. M. (2007). Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J Virol* **81**, 7732-41.
- Cho, M. W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K. & Ehrenfeld, E. (1994). Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* **202**, 129-45.
- Choi, S. S., Rasshofer, R. & Roggendorf, M. (1989). Inhibition of hepatitis delta virus RNA replication in primary woodchuck hepatocytes. *Antiviral Res* **12**, 213-22.
- Chung, D. H., Sun, Y., Parker, W. B., Arterburn, J. B., Bartolucci, A. & Jonsson, C. B. (2007). Ribavirin reveals a lethal threshold of allowable mutation frequency for Hantaan virus. *J Virol* **81**, 11722-9.
- Davern, C. I. & Bonner, J. (1958). The influence of 5-fluorouracil on tobacco-mosaic virus production in tobacco-leaf discs. *Biochim Biophys Acta* **29**, 205-6.
- Davis, G. L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V., Hoefs, J., Gordon, S. C., Trepo, C., Shiffman, M. L., Zeuzem, S., Craxi, A., Ling, M. H. & Albrecht, J. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1493-9.
- Day, C. W., Smee, D. F., Julander, J. G., Yamshchikov, V. F., Sidwell, R. W. & Morrey, J. D. (2005). Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res.* **67**, 38-45.
- De Benedetti, A. & Graff, J. R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* **23**, 3189-99.
- de Clercq, E. (1987). Virus-drug resistance: thymidine kinase-deficient (TK-) mutants of herpes simplex virus. Therapeutic approaches. *Ann Ist Super Sanita* **23**, 841-7.
- de Felipe, P., Hughes, L. E., Ryan, M. D. & Brown, J. D. (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem* **278**, 11441-8.
- de Felipe, P. & Ryan, M. D. (2004). Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences. *Traffic* **5**, 616-26.
- de Jong, A. S., de Mattia, F., Van Dommelen, M. M., Lanke, K., Melchers, W. J., Willems, P. H. & van Kuppeveld, F. J. (2008). Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J Virol* **82**, 3782-90.
- de Jong, J. C., Claas, E. C., Osterhaus, A. D., Webster, R. G. & Lim, W. L. (1997). A pandemic warning? *Nature* **389**, 554.
- de la Torre, J. C. (2005). Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. *Virus Res* **107**, 207-14.
- de la Torre, J. C., Alarcón, B., Martínez-Salas, E., Carrasco, L. & Domingo, E. (1987). Ribavirin cures cells of a persistent infection with foot-and-mouth disease virus *in vitro*. *J. Virol.* **61**, 233-235.

- de la Torre, J. C., Martinez-Salas, E., Diez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Davila, M. & Domingo, E. (1988). Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**, 2050-8.
- de la Torre, J. C., Wimmer, E. & Holland, J. J. (1990). Very high frequency of reversion to guanidine resistance in clonal pools of guanidine-dependent type 1 poliovirus. *J. Virol.* **64**, 664-71.
- de Los Santos, T., de Avila Botton, S., Weiblen, R. & Grubman, M. J. (2006). The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J Virol* **80**, 1906-14.
- De Palma, A. M., Heggermont, W., Lanke, K., Coutard, B., Bergmann, M., Monforte, A. M., Canard, B., De Clercq, E., Chimirri, A., Purstinger, G., Rohayem, J., van Kuppeveld, F. & Neyts, J. (2008). The thiazolobenzimidazole TBZE-029 inhibits enterovirus replication by targeting a short region immediately downstream from motif C in the nonstructural protein 2C. *J Virol* **82**, 4720-30.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. & Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng* **3**, 461-7.
- Devaney, M. A., Vakharia, V. N., Lloyd, R. E., Ehrenfeld, E. & Grubman, M. J. (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* **62**, 4407-9.
- Di Bisceglie, A. M., Thompson, J., Smith-Wilkaitis, N., Brunt, E. M. & Bacon, B. R. (2001). Combination of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: re-treatment of nonresponders to interferon. *Hepatology* **33**, 704-7.
- Dixit, N. M., Layden-Almer, J. E., Layden, T. J. & Perelson, A. S. (2004). Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature* **432**, 922-4.
- Doedens, J. R. & Kirkegaard, K. (1995). Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* **14**, 894-907.
- Domingo, E. (2006). Quasispecies: Concepts and Implications for Virology. Current Topics in Microbiology and Immunology. .
- Domingo, E. (2007). Virus Evolution. In *Fields I, Vol.12.*, eds. 5th edn, pp. 389-421. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Domingo, E., Biebricher, C., Eigen, M. & Holland, J. J. (2001). Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. Austin: Landes Bioscience.
- Domingo, E., Davila, M. & Ortin, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**, 333-46.
- Domingo, E., editor (2005). Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. *Virus Res.* **107**, 115-228.
- Domingo, E. & Gomez, J. (2007). Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res.*
- Domingo, E., Grande-Perez, A. & Martin, V. (2008). Future prospects for the treatment of rapidly evolving viral pathogens: insights from evolutionary biology. *Expert Opin Biol Ther* **8**, 1455-60.
- Domingo, E. & Holland, J. J. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In *Evolutionary Biology of Viruses*, pp. 161-184. Edited by S. S. Morse. New York: Raven Press.
- Domingo, E. & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151-178.
- Domingo, E., Holland, J. J. & Ahlquist, P. (1988). RNA Genetics. Boca Raton: CRC Press.
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N. & Holland, J. J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* **40**, 1-8.
- Domingo, E., Menéndez-Arias, L., Quiñones-Mateu, M. E., Holguín, A., Gutiérrez-Rivas, M., Martínez, M. A., Quer, J., Novella, I. S. & Holland, J. J. (1997). Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog. Drug. Res.* **48**, 99-128.

- Domingo, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Arias, A., Molina-Paris, C., Briones, C., Baranowski, E. & Escarmís, C. (2003). Detection and biological implications of genetic memory in viral quasispecies. In *Cardiomyopathies and Heart Failure: Biomolecular, Infectious and Immune Mechanisms*, pp. 259-276. Edited by A. Matsumori. London, UK: Kluwer Academic Publishers.
- Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T. & Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**, 735-744.
- Doong, S. L. & Dolnick, B. J. (1988). 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing in vitro. *J Biol Chem* **263**, 4467-73.
- Dragun, M., Rada, B., Novotny, L. & Beranek, J. (1990). Antiviral activities of pyrimidine nucleoside analogues: some structure--activity relationships. *Acta Virol.* **34**, 321-9.
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7160-7164.
- Drake, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4171-5.
- Drake, J. W. & Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13910-13913.
- Drosten, C., Preiser, W., Gunther, S., Schmitz, H. & Doerr, H. W. (2003). Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med* **9**, 325-7.
- Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E. & Holland, J. (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6015-6019.
- Duarte, E. A., Novella, I. S., Ledesma, S., Clarke, D. K., Moya, A., Elena, S. F., Domingo, E. & Holland, J. J. (1994a). Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *J. Virol.* **68**, 4295-4301.
- Duarte, E. A., Novella, I. S., Weaver, S. C., Domingo, E., Wain-Hobson, S., Clarke, D. K., Moya, A., Elena, S. F., de la Torre, J. C. & Holland, J. J. (1994b). RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect. Agents Dis.* **3**, 201-214.
- Dulbecco, R. & Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-7.
- Eastman, P. S. & Blair, C. D. (1985). Temperature-sensitive mutants of Japanese encephalitis virus. *J Virol* **55**, 611-6.
- Eckerle, L. D., Lu, X., Sperry, S. M., Choi, L. & Denison, M. R. (2007). High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. *J Virol* **81**, 12135-44.
- Echeverri, A., Banerjee, R. & Dasgupta, A. (1998). Amino-terminal region of poliovirus 2C protein is sufficient for membrane binding. *Virus Res* **54**, 217-23.
- Echeverri, A. C. & Dasgupta, A. (1995). Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* **208**, 540-53.
- Echols, H. & Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**, 477-511.
- Edell, D., Bruce, E., Hale, K., Edell, D. & Khoshoo, V. (1998). Reduced long-term respiratory morbidity after treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis with ribavirin in previously healthy infants: a preliminary report. *Pediatr Pulmonol* **25**, 154-8.
- Eigen, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-523.
- Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci. Am.* **269**, 42-9.
- Eigen, M. (2002). Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13374-6.
- Eigen, M. & Biebricher, C. K. (1988). Sequence space and quasispecies distribution. In *RNA Genetics*, pp. 211-245. Edited by E. Domingo, P. Ahlquist & J. J. Holland. Boca Raton, FL.: CRC Press.
- Eigen, M., McCaskill, J. & Schuster, P. (1988). Molecular quasi-species. *J. Phys. Chem.* **92**, 6881-6891.

- Eigen, M. & Schuster, P. (1979). The hypercycle. A principle of natural self-organization. Berlin: Springer.
- Elena, S. F., Gonzalez-Candelas, F., Novella, I. S., Duarte, E. A., Clarke, D. K., Domingo, E., Holland, J. J. & Moya, A. (1996). Evolution of fitness in experimental populations of vesicular stomatitis virus. *Genetics* **142**, 673-9.
- Escarmís, C., Carrillo, E. C., Ferrer, M., Arriaza, J. F., Lopez, N., Tami, C., Verdaguer, N., Domingo, E. & Franze-Fernández, M. T. (1998). Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *J. Virol* **72**, 10171-10179.
- Escarmís, C., Davila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A. & Domingo, E. (1996). Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**, 255-67.
- Escarmís, C., Dávila, M. & Domingo, E. (1999). Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J. Mol. Biol.* **285**, 495-505.
- Escarmís, C., Dopazo, J., Dávila, M., Palma, E. L. & Domingo, E. (1995). Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res.* **35**, 155-167.
- Escarmís, C., Lazaro, E., Arias, A. & Domingo, E. (2008). Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implications for viral extinction. *J Mol Biol* **376**, 367-79.
- Escarmís, C., Lázaro, E. & Manrubia, S. C. (2006). Population bottlenecks in quasispecies dynamics. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* **299**, 141-170.
- Escarmís, C., Toja, M., Medina, M. & Domingo, E. (1992). Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res.* **26**, 113-125.
- Falk, M. M., Sobrino, F. & Beck, E. (1992). VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **66**, 2251-60.
- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., Strazzer, A., Chien, D. Y., Munoz, S. J., Balestrieri, A., Purcell, R. H. & Alter, H. J. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**, 339-44.
- Feld, J. J. & Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**, 967-72.
- Fernandez-Larsson, R., O'Connell, K., Koumans, E. & Patterson, J. L. (1989). Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 1668-73.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2006a). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J* **25**, 880-8.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmis, C. & Verdaguer, N. (2006b). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 27-34.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 47212-21.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2007). Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9463-8.
- Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzynska-Kokorniak, A. & Figlerowicz, M. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Medicinal Res. Reviews* **23**, 488-518.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2009). Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control, 3rd edn. Washington, D.C.: ASM Press.
- Frank, A. C. & Lobry, J. R. (1999). Asymmetric substitution patterns: a review of possible underlying mutational or selective mechanisms. *Gene* **238**, 65-77.

- Frank, E. G. & Woodgate, R. (2007). Increased catalytic activity and altered fidelity of human DNA polymerase ϵ in the presence of manganese. *J Biol Chem* **282**, 24689-96.
- Frank, K. B., McKernan, P. A., Smith, R. A. & Smee, D. F. (1987). Visna virus as an in vitro model for human immunodeficiency virus and inhibition by ribavirin, phosphonoformate, and 2',3'-dideoxynucleosides. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 1369-74.
- Freistadt, M. S., Meades, G. D. & Cameron, C. E. (2004). Lethal mutagens: broad-spectrum antivirals with limited potential for development of resistance? *Drug Resist Updat.* **7**, 19-24.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A. & Ellenberger, T. (2006). DNA repair and mutagenesis. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Frings, W. & Dotzauer, A. (2001). Adaptation of primate cell-adapted hepatitis A virus strain HM175 to growth in guinea pig cells is independent of mutations in the 5' nontranslated region. *J Gen Virol* **82**, 597-602.
- Fry, E. E., Stuart, D. I. & Rowlands, D. J. (2005). The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **288**, 71-101.
- Furtado, M. R., Callaway, D. S., Phair, J. P., Kunstman, K. J., Stanton, J. L., Macken, C. A., Perelson, A. S. & Wolinsky, S. M. (1999). Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1614-22.
- Galtier, N. & Lobry, J. R. (1997). Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. *J Mol Evol* **44**, 632-6.
- Gallois-Montbrun, S., Chen, Y., Dutartre, H., Sophys, M., Morera, S., Guerreiro, C., Schneider, B., Mulard, L., Janin, J., Veron, M., Deville-Bonne, D. & Canard, B. (2003). Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol Pharmacol* **63**, 538-46.
- Garcia-Arriaza, J., Domingo, E. & Escarmis, C. (2005). A segmented form of foot-and-mouth disease virus interferes with standard virus: a link between interference and competitive fitness. *Virology* **335**, 155-64.
- Garcia-Arriaza, J., Manrubia, S. C., Toja, M., Domingo, E. & Escarmis, C. (2004). Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* **78**, 11678-85.
- Garcia, S., Crance, J. M., Billecocq, A., Peinnequin, A., Jouan, A., Bouloy, M. & Garin, D. (2001). Quantitative real-time PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds. *J Clin Microbiol* **39**, 4456-61.
- Ge, L., Zhang, J., Zhou, X. & Li, H. (2007). Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *J Virol* **81**, 5902-7.
- Gebauer, F., de la Torre, J. C., Gomes, I., Mateu, M. G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., de Mello, P. A. & Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.* **62**, 2041-2049.
- Ghosh, A., Nayak, R. & Shaila, M. S. (1996). Inhibition of replication of rinderpest virus by 5-fluorouracil. *Antiviral Res.* **31**, 35-44.
- Ghoshal, K. & Jacob, S. T. (1994). Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res* **54**, 632-6.
- Ghoshal, K. & Jacob, S. T. (1997). An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem Pharmacol* **53**, 1569-75.
- Giraud, A. T., Beck, E., Strebel, K., de Mello, P. A., La Torre, J. L., Scodeller, E. A. & Bergmann, I. E. (1990). Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* **177**, 780-3.
- Glaser, W. & Skern, T. (2000). Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A in vitro. *FEBS Lett* **480**, 151-5.

- Gonzalez-Lopez, C., Arias, A., Pariente, N., Gomez-Mariano, G. & Domingo, E. (2004). Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J Virol* **78**, 3319-24.
- Gonzalez-Lopez, C., Gomez-Mariano, G., Escarmis, C. & Domingo, E. (2005). Invariant aphthovirus consensus nucleotide sequence in the transition to error catastrophe. *Infect Genet Evol* **5**, 366-74.
- Goodfellow, I. G., Polacek, C., Andino, R. & Evans, D. J. (2003). The poliovirus 2C cis-acting replication element-mediated uridylylation of VPg is not required for synthesis of negative-sense genomes. *J Gen Virol* **84**, 2359-63.
- Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. (1989). Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res* **17**, 8413-40.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett* **235**, 16-24.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. & Wolf, Y. I. (1990). A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett* **262**, 145-8.
- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddam, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalkmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. & Ward, V. K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J Mol Biol* **324**, 47-62.
- Gordon, M. P. & Staehelin, M. (1959). Studies on the incorporation of 5-fluorouracil into a virus nucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 351-61.
- Goswami, B. B., Borek, E., Sharma, O. K., Fujitaki, J. & Smith, R. A. (1979). The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 830-6.
- Graci, J. D. & Cameron, C. E. (2004). Challenges for the development of ribonucleoside analogues as inducers of error catastrophe. *Antivir. Chem. Chemother.* **15**, 1-13.
- Graci, J. D., Harki, D. A., Korneeva, V. S., Edathil, J. P., Too, K., Franco, D., Smidansky, E. D., Paul, A. V., Peterson, B. R., Brown, D. M., Loakes, D. & Cameron, C. E. (2007). Lethal mutagenesis of poliovirus mediated by a mutagenic pyrimidine analogue. *J Virol* **81**, 11256-66.
- Graci, J. D., Too, K., Smidansky, E. D., Edathil, J. P., Barr, E. W., Harki, D. A., Galarraga, J. E., Bollinger, J. M., Jr., Peterson, B. R., Loakes, D., Brown, D. M. & Cameron, C. E. (2008). Lethal mutagenesis of picornaviruses with N-6-modified purine nucleoside analogues. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 971-9.
- Graham, A. F. & Kirk, C. (1965). Effect of 5-fluorouracil on the growth of bacteriophage R17. *J Bacteriol* **90**, 928-35.
- Grande-Perez, A., Gomez-Mariano, G., Lowenstein, P. R. & Domingo, E. (2005a). Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J Virol* **79**, 10451-9.
- Grande-Perez, A., Lazaro, E., Lowenstein, P., Domingo, E. & Manrubia, S. C. (2005b). Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4448-52.
- Grande-Pérez, A., Sierra, S., Castro, M. G., Domingo, E. & Lowenstein, P. R. (2002). Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12938-43.
- Griffiths, G., Warren, G., Quinn, P., Mathieu-Costello, O. & Hoppeler, H. (1984). Density of newly synthesized plasma membrane proteins in intracellular membranes. I. Stereological studies. *J Cell Biol* **98**, 2133-41.
- Gromeier, M., Wimmer, E. & Gorbalenya, A. E. (1999). Genetics, pathogenesis and evolution of picornaviruses. In *Origin and Evolution of Viruses*, pp. 287-343. Edited by E. Domingo, R. G. Webster & J. J. Holland. San Diego: Academic Press.

- Guarne, A., Tormo, J., Kirchweyer, R., Pfistermueller, D., Fita, I. & Skern, T. (1998). Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *Embo J* **17**, 7469-79.
- Gubitz, A. K., Mourelatos, Z., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. & Dreyfuss, G. (2002). Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem* **277**, 5631-6.
- Hadaschik, D., Klein, M., Zimmermann, H., Eggers, H. J. & Nelsen-Salz, B. (1999). Dependence of echovirus 9 on the enterovirus RNA replication inhibitor 2-(alpha-Hydroxybenzyl)-benzimidazole maps to nonstructural protein 2C. *J Virol* **73**, 10536-9.
- Hall, C. B., McBride, J. T., Walsh, E. E., Bell, D. M., Gala, C. L., Hildreth, S., Ten Eyck, L. G. & Hall, W. J. (1983). Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection. A randomized double-blind study. *N Engl J Med* **308**, 1443-7.
- Hansen, J., Long, A. M. & Schultz, S. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **15**, 1109-1122.
- Harki, D. A., Graci, J. D., Edathil, J. P., Castro, C., Cameron, C. E. & Peterson, B. R. (2007). Synthesis of a universal 5-nitroindole ribonucleotide and incorporation into RNA by a viral RNA-dependent RNA polymerase. *ChemBiochem* **8**, 1359-62.
- Harki, D. A., Graci, J. D., Galaraga, J. E., Chain, W. J., Cameron, C. E. & Peterson, B. R. (2006). Synthesis and antiviral activity of 5-substituted cytidine analogues: identification of a potent inhibitor of viral RNA-dependent RNA polymerases. *J Med Chem* **49**, 6166-9.
- Harris, D., Kaushik, N., Pandey, P. K., Yadav, P. N. & Pandey, V. N. (1998). Functional analysis of amino acid residues constituting the dNTP binding pocket of HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **273**, 33624-34.
- Harris, K. S., Brabant, W., Styrchak, S., Gall, A. & Daifuku, R. (2005). KP-1212/1461, a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis. *Antiviral Res.* **67**, 1-9.
- Haspel, M. V., Lampert, P. W. & Oldstone, M. B. (1978). Temperature-sensitive mutants of mouse hepatitis virus produce a high incidence of demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4033-4036.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E. & Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature* **179**, 663-6.
- Herold, J. & Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**, 581-91.
- Herrera, M., Garcia-Arriaza, J., Pariente, N., Escarmis, C. & Domingo, E. (2007). Molecular basis for a lack of correlation between viral fitness and cell killing capacity. *PLoS Pathog* **3**, e53.
- Herrmann, E., Lee, J. H., Marinos, G., Modi, M. & Zeuzem, S. (2003). Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* **37**, 1351-8.
- Ho, D. D. (1995). Time to hit HIV, early and hard. *N. Engl. J. Med.* **333**, 450-1.
- Hofmann, W. P., Polta, A., Herrmann, E., Mihm, U., Kronenberger, B., Sonntag, T., Lohmann, V., Schonberger, B., Zeuzem, S. & Sarrazin, C. (2007). Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasiespecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* **132**, 921-30.
- Holland, J. J., de la Torre, J. C., Clarke, D. K. & Duarte, E. (1991). Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* **65**, 2960-2967.
- Holland, J. J., Domingo, E., de la Torre, J. C. & Steinhauer, D. A. (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* **64**, 3960-3962.
- Holland, J. J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. & VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**, 1577-1585.

- Hong, Z. & Cameron, C. E. (2002). Pleiotropic mechanisms of ribavirin antiviral activities. *Prog Drug Res* **59**, 41-69.
- Hopkins, R. L. & Goodman, M. F. (1980). Deoxyribonucleotide pools, base pairing, and sequence configuration affecting bromodeoxyuridine- and 2-aminopurine-induced mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1801-5.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S. D., Hargittai, M. R., Chen, Y., Arnold, J. J., Raney, K. D. & Cameron, C. E. (2005). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* **280**, 36417-28.
- Huggins, J. W. (1989). Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 4**, S750-61.
- Hultgren, C., Milich, D. R., Weiland, O. & Sallberg, M. (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* **79** (Pt 10), 2381-91.
- Hurst, L. D. & Merchant, A. R. (2001). High guanine-cytosine content is not an adaptation to high temperature: a comparative analysis amongst prokaryotes. *Proc Biol Sci* **268**, 493-7.
- Ingraham, H. A., Tseng, B. Y. & Goulian, M. (1982). Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine. *Mol Pharmacol* **21**, 211-6.
- Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B. & Peterschmitt, M. (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J. Gen. Virol.* **79**, 3091-9.
- Jackson, T., King, A. M., Stuart, D. I. & Fry, E. (2003). Structure and receptor binding. *Virus Res.* **91**, 33-46.
- Jager, J. & Pata, J. D. (1999). Getting a grip: polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 21-8.
- Jang, S. K., Pestova, T. V., Hellen, C. U., Witherell, G. W. & Wimmer, E. (1990). Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* **44**, 292-309.
- Jordan, I., Briese, T., Averett, D. R. & Lipkin, W. I. (1999). Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin. *J Virol* **73**, 7903-6.
- Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J. Y. & Lipkin, W. I. (2000). Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis* **182**, 1214-7.
- Joyce, C. M. & Steitz, T. A. (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme? *J Bacteriol* **177**, 6321-9.
- Kabbinavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Meropol, N. J., Novotny, W. F., Lieberman, G., Griffing, S. & Bergsland, E. (2003). Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 60-5.
- Kadare, G. & Haenni, A. L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* **71**, 2583-90.
- Kai, K. & Furuta, T. (1984). Isolation of paralysis-inducing murine leukemia viruses from Friend virus passaged in rats. *J Virol* **50**, 970-3.
- Kamal, S. M., Fehr, J., Roesler, B., Peters, T. & Rasenack, J. W. (2002). Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **123**, 1070-83.
- Kanamaru, R., Kakuta, H., Sato, T., Ishioka, C. & Wakui, A. (1986). The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* **17**, 43-6.
- Kanda, T., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tanaka, M., Shino, Y., Shimada, H., Tomonaga, T., Nomura, F., Nagao, K., Ochiai, T. & Saisho, H. (2004). Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells: ribavirin induces mutagenesis in HCV RNA. *J. Viral. Hepat.* **11**, 479-87.

- Kentsis, A., Topisirovic, I., Culjkovic, B., Shao, L. & Borden, K. L. (2004). Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18105-10.
- Kettenberger, H., Armache, K. J. & Cramer, P. (2004). Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell* **16**, 955-65.
- Kim, B., Ayran, J. C., Sagar, S. G., Adman, E. T., Fuller, S. M., Tran, N. H. & Horrigan, J. (1999). New human immunodeficiency virus, type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) mutants with increased fidelity of DNA synthesis. Accuracy, template binding, and processivity. *J Biol Chem* **274**, 27666-73.
- Kim, T. W., Briebe, L. G., Ellenberger, T. & Kool, E. T. (2006). Functional evidence for a small and rigid active site in a high fidelity DNA polymerase: probing T7 DNA polymerase with variably sized base pairs. *J Biol Chem* **281**, 2289-95.
- Klein, M., Eggers, H. J. & Nelsen-Salz, B. (1999). Echovirus 9 strain barty non-structural protein 2C has NTPase activity. *Virus Res* **65**, 155-60.
- Klein, M., Eggers, H. J. & Nelsen-Salz, B. (2000a). Echovirus-9 protein 2C binds single-stranded RNA unspecifically. *J Gen Virol* **81**, 2481-4.
- Klein, M., Hadaschik, D., Zimmermann, H., Eggers, H. J. & Nelsen-Salz, B. (2000b). The picornavirus replication inhibitors HBB and guanidine in the echovirus-9 system: the significance of viral protein 2C. *J Gen Virol* **81**, 895-901.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. & Steitz, T. A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**, 1783-90.
- Korneeva, V. S. & Cameron, C. E. (2007). Structure-function relationships of the viral RNA-dependent RNA polymerase: fidelity, replication speed, and initiation mechanism determined by a residue in the ribose-binding pocket. *J Biol Chem* **282**, 16135-45.
- Kouroussis, C., Souglakos, J., Mavroudis, D., Papadouris, S., Kakolyris, S., Agelaki, S., Kalbakis, K., Panopoulos, C., Vardakis, N., Sarra, E. & Georgoulas, V. (2002). Oxaliplatin with high-dose leucovorin and infusional 5-fluorouracil in irinotecan-pretreated patients with advanced colorectal cancer (ACC). *Am J Clin Oncol* **25**, 627-31.
- Kretzschmar, A., Reichardt, P., Thuss-Patience, P. C., Hohenberger, P., Benter, T., Dorken, B. & Kohne, C. H. (2000). Weekly 24-hour infusion of high-dose 5-fluorouracil plus folinic acid in combination with mitomycin C for the treatment of advanced gastric cancer. *Oncology* **59**, 14-7.
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J. & Anderson, L. J. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**, 1953-66.
- Kunkel, T. A. & Alexander, P. S. (1986). The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *J Biol Chem* **261**, 160-6.
- Kunkel, T. A., Meyer, R. R. & Loeb, L. A. (1979). Single-strand binding protein enhances fidelity of DNA synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 6331-5.
- Kunz, B. A. & Kohalmi, S. E. (1991). Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels. *Annu Rev Genet* **25**, 339-59.
- Kunz, S., Sevilla, N., McGavern, D. B., Campbell, K. P. & Oldstone, M. B. (2001). Molecular analysis of the interaction of LCMV with its cellular receptor [alpha]-dystroglycan. *J Cell Biol* **155**, 301-10.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

- Lanford, R. E., Chavez, D., Guerra, B., Lau, J. Y., Hong, Z., Brasky, K. M. & Beames, B. (2001). Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J. Virol.* **75**, 8074-81.
- Larder, B. A. (1994). Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Gen Virol* **75** (Pt 5), 951-7.
- Larsen, G. R., Dorner, A. J., Harris, T. J. & Wimmer, E. (1980). The structure of poliovirus replicative form. *Nucleic Acids Res* **8**, 1217-29.
- Lasken, R. S. & Goodman, M. F. (1984). The biochemical basis of 5-bromouracil-induced mutagenesis. Heteroduplex base mispairs involving bromouracil in G x C----A x T and A x T----G x C mutational pathways. *J. Biol. Chem.* **259**, 11491-5.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J. & et al. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**, 123-39.
- Lee, C. H., Gilbertson, D. L., Novella, I. S., Huerta, R., Domingo, E. & Holland, J. J. (1997). Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **71**, 3636-3640.
- Lemon, S. M. (1997a). Targeting the Achilles' heel of hepatitis C virus. *Hepatology* **25**, 1035-7.
- Lemon, S. M. (1997b). Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* **43**, 1494-9.
- Lenz, H. J., Manno, D. J., Danenberg, K. D. & Danenberg, P. V. (1994). Incorporation of 5-fluorouracil into U2 and U6 snRNA inhibits mRNA precursor splicing. *J Biol Chem* **269**, 31962-8.
- Lewis, D. A., Bebenek, K., Beard, W. A., Wilson, S. H. & Kunkel, T. A. (1999). Uniquely altered DNA replication fidelity conferred by an amino acid change in the nucleotide binding pocket of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **274**, 32924-30.
- Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J. A., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakonyi, G. & Chen, X. S. (2003). Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* **423**, 512-8.
- Li, J. P. & Baltimore, D. (1990). An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating defect. *J Virol* **64**, 1102-7.
- Loeb, L. A., Essigmann, J. M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K. D. & Mullins, J. I. (1999). Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1492-1497.
- Loeb, L. A. & Mullins, J. I. (2000). Lethal mutagenesis of HIV by mutagenic ribonucleoside analogs. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**, 1-3.
- Loeffler, F. & Frosch, P. (1898). Berichte der komission zur erforschung der maul-und klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* **23**, 371-391.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**, 330-8.
- López-Bueno, A., Villarreal, L. P. & Almendral, J. M. (2006). Parvovirus variation for disease: A difference with RNA viruses? In *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, pp. 349-370.
- Lopez de Quinto, S., Saiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F. & Martinez-Salas, E. (2002). IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res* **30**, 4398-405.
- Love, R. A., Maegley, K. A., Yu, X., Ferre, R. A., Lingardo, L. K., Diehl, W., Parge, H. E., Dragovich, P. S. & Fuhrman, S. A. (2004). The crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from human rhinovirus: a dual function target for common cold antiviral therapy. *Structure* **12**, 1533-44.
- Lowe, J. K., Brox, L. & Henderson, J. F. (1977). Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis by mycophenolic acid and virazole. *Cancer Res.* **37**, 736-43.

- Lyons, T., Murray, K. E., Roberts, A. W. & Barton, D. J. (2001). Poliovirus 5'-terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **75**, 10696-708.
- Maag, D., Castro, C., Hong, Z. & Cameron, C. E. (2001). Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* **276**, 46094-8.
- Maciejewski, M. W., Pan, B., Shin, R., Denninger, A. & Mullen, G. P. (2001). ¹H, ¹⁵N, and ¹³C resonance assignments for a 20 kDa DNA polymerase from African swine fever virus. *J Biomol NMR* **21**, 177-8.
- Mangia, A., Santoro, R., Minerva, N., Ricci, G. L., Carretta, V., Persico, M., Vinelli, F., Scotto, G., Bacca, D., Annese, M., Romano, M., Zechini, F., Sogari, F., Spirito, F. & Andriulli, A. (2005). Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* **352**, 2609-17.
- Marcotte, L. L., Wass, A. B., Gohara, D. W., Pathak, H. B., Arnold, J. J., Filman, D. J., Cameron, C. E. & Hogle, J. M. (2007). Crystal structure of poliovirus 3CD protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **81**, 3583-96.
- Marroqui, L., Estepa, A. & Perez, L. (2007). Assessment of the inhibitory effect of ribavirin on the rainbow trout rhabdovirus VHSV by real-time reverse-transcription PCR. *Vet Microbiol* **122**, 52-60.
- Martinez-Salas, E. (2008). The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity. *Trends Microbiol* **16**, 230-7.
- Martinez-Salas, E. & Fernandez-Miragall, O. (2004). Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr Pharm Des* **10**, 3757-67.
- Martinez-Salas, E., Lopez de Quinto, S., Ramos, R. & Fernandez-Miragall, O. (2002). IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* **84**, 755-63.
- Martinez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P. & Fernandez, N. (2008). New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* **89**, 611-26.
- Martínez, M. A., Carrillo, C., González-Candelas, F., Moya, A., Domingo, E. & Sobrino, F. (1991). Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J. Virol.* **65**, 3954-3957.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T. & Suzuki, T. (2008). Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* **82**, 7964-76.
- Mason, P. W., Bezborodova, S. V. & Henry, T. M. (2002). Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**, 9686-94.
- Mason, P. W., Grubman, M. J. & Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res.* **91**, 9-32.
- Masuda, M., Hanson, C. A., Alvord, W. G., Hoffman, P. M., Ruscetti, S. K. & Masuda, M. (1996a). Effects of subtle changes in the SU protein of ecotropic murine leukemia virus on its brain capillary endothelial cell tropism and interference properties. *Virology* **215**, 142-51.
- Masuda, M., Masuda, M., Hanson, C. A., Hoffman, P. M. & Ruscetti, S. K. (1996b). Analysis of the unique hamster cell tropism of ecotropic murine leukemia virus PVC-211. *J Virol* **70**, 8534-9.
- Masuda, M., Remington, M. P., Hoffman, P. M. & Ruscetti, S. K. (1992). Molecular characterization of a neuropathogenic and nonerythroleukemogenic variant of Friend murine leukemia virus PVC-211. *J Virol* **66**, 2798-806.
- Mateu, M. G. (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.* **38**, 1-24.

- Mateu, M. G., Da Silva, J. L., Rocha, E., De Brum, D. L., Alonso, A., Enjuanes, L., Domingo, E. & Barahona, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* **167**, 113-124.
- Mateu, M. G., Martinez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. & Domingo, E. (1990a). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* **71** (Pt 3), 629-37.
- Mateu, M. G., Martínez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. & Domingo, E. (1990b). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. Gen. Virol.* **71**, 629-637.
- Mateu, M. G., Martínez, M. A., Rocha, E., Andreu, D., Parejo, J., Giralt, E., Sobrino, F. & Domingo, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5883-5887.
- Matloubian, M., Kolhekar, S. R., Somasundaram, T. & Ahmed, R. (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **67**, 7340-9.
- McCormick, J. B., Getchell, J. P., Mitchell, S. W. & Hicks, D. R. (1984). Ribavirin suppresses replication of lymphadenopathy-associated virus in cultures of human adult T lymphocytes. *Lancet* **2**, 1367-9.
- McCormick, J. B., King, I. J., Webb, P. A., Scribner, C. L., Craven, R. B., Johnson, K. M., Elliott, L. H. & Belmont-Williams, R. (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* **314**, 20-6.
- McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., Goodman, Z. D., Ling, M. H., Cort, S. & Albrecht, J. K. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1485-92.
- Medina, R. A., Mirowsky-Garcia, K., Hutt, J. & Hjelle, B. (2007). Ribavirin, human convalescent plasma and anti-beta3 integrin antibody inhibit infection by Sin Nombre virus in the deer mouse model. *J Gen Virol* **88**, 493-505.
- Meinke, G., Bullock, P. A. & Bohm, A. (2006). Crystal structure of the simian virus 40 large T-antigen origin-binding domain. *J Virol* **80**, 4304-12.
- Mikkelsen, J. G. & Pedersen, F. S. (2000). Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses. *J Biomed Sci* **7**, 77-99.
- Miller, V. & Larder, B. A. (2001). Mutational patterns in the HIV genome and cross-resistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure. *Antivir. Ther.* **6 Suppl 3**, 25-44.
- Minnick, D. T., Bebenek, K., Osherooff, W. P., Turner, R. M., Jr., Astatke, M., Liu, L., Kunkel, T. A. & Joyce, C. M. (1999). Side chains that influence fidelity at the polymerase active site of Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment). *J Biol Chem* **274**, 3067-75.
- Mirmomeni, M. H., Hughes, P. J. & Stanway, G. (1997). An RNA tertiary structure in the 3' untranslated region of enteroviruses is necessary for efficient replication. *J Virol* **71**, 2363-70.
- Mirzayan, C. & Wimmer, E. (1994). Biochemical studies on poliovirus polypeptide 2C: evidence for ATPase activity. *Virology* **199**, 176-87.
- Mitrovski, B., Pressacco, J., Mandelbaum, S. & Erlichman, C. (1994). Biochemical effects of folate-based inhibitors of thymidylate synthase in MGH-U1 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **35**, 109-14.
- Moffat, K., Knox, C., Howell, G., Clark, S. J., Yang, H., Belsham, G. J., Ryan, M. & Wileman, T. (2007). Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol* **81**, 1129-39.

- Morasco, B. J., Sharma, N., Parilla, J. & Flanagan, J. B. (2003). Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **77**, 5136-44.
- Morgenstern, B., Michaelis, M., Baer, P. C., Doerr, H. W. & Cinatl, J., Jr. (2005). Ribavirin and interferon-beta synergistically inhibit SARS-associated coronavirus replication in animal and human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **326**, 905-8.
- Moriyama, K., Suzuki, T., Negishi, K., Graci, J. D., Thompson, C. N., Cameron, C. E. & Watanabe, M. (2008). Effects of introduction of hydrophobic group on ribavirin base on mutation induction and anti-RNA viral activity. *J Med Chem* **51**, 159-66.
- Morse, S. S. (1994). *The Evolutionary Biology of Viruses*. New York: Raven Press.
- Mosser, A. G., Sgro, J. Y. & Rueckert, R. R. (1994). Distribution of drug resistance mutations in type 3 poliovirus identifies three regions involved in uncoating functions. *J. Virol.* **68**, 8193-201.
- Mozzherin, D. J., McConnell, M., Jasko, M. V., Krayevsky, A. A., Tan, C. K., Downey, K. M. & Fisher, P. A. (1996). Proliferating cell nuclear antigen promotes misincorporation catalyzed by calf thymus DNA polymerase delta. *J Biol Chem* **271**, 31711-7.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.* **1**, 2-9.
- Muller, W. E., Maidhof, A., Taschner, H. & Zahn, R. K. (1977). Virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; a cytostatic agent. *Biochem Pharmacol* **26**, 1071-5.
- Munyon, W. & Salzman, N. P. (1962). The incorporation of 5-fluoro-uracil into poliovirus. *Virology* **18**, 95-101.
- Murphy, F. A. (1994). New, emerging, and reemerging infectious diseases. *Adv. Virus Res.* **43**, 1-52.
- Murphy, F. A. & Nathanson, N. (1994). The emergence of new virus diseases: an overview. *Seminars in Virology* **5**, 87-102.
- Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Tanabe, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. & Takashima, I. (2001). Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *J Vet Med Sci* **63**, 637-45.
- Murray, K. E. & Barton, D. J. (2003). Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **77**, 4739-50.
- Nájera, I., Holguín, A., Quiñones-Mateu, M. E., Muñoz-Fernández, M. A., Nájera, R., López-Galíndez, C. & Domingo, E. (1995). Pol gene quasiespecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J. Virol.* **69**, 23-31.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G. & Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* **79**, 7698-706.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., Woolaway, K. E., Birtley, J., Curry, S. & Belsham, G. J. (2006). Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* **80**, 9865-75.
- Ng, K. K., Cherney, M. M., Vazquez, A. L., Machin, A., Alonso, J. M., Parra, F. & James, M. N. (2002). Crystal structures of active and inactive conformations of a caliciviral RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**, 1381-7.
- Ng, K. K., Pendas-Franco, N., Rojo, J., Boga, J. A., Machin, A., Alonso, J. M. & Parra, F. (2004). Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J Biol Chem* **279**, 16638-45.
- Nichol, S. T., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S. & Peters, C. J. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* **262**, 914-7.
- Ning, Q., Brown, D., Parodo, J., Catral, M., Gorczynski, R., Cole, E., Fung, L., Ding, J. W., Liu, M. F., Rotstein, O., Phillips, M. J. & Levy, G. (1998). Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase

- and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* **160**, 3487-93.
- Niwa, K., Tagami, K., Lian, Z., Gao, J., Mori, H. & Tamaya, T. (2003). Topical vidarabine or 5-fluorouracil treatment against persistent HPV in genital (pre)cancerous lesions. *Oncol Rep* **10**, 1437-41.
- Novella, I. S., Duarte, E. A., Elena, S. F., Moya, A., Domingo, E. & Holland, J. J. (1995a). Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5841-5844.
- Novella, I. S., Elena, S. F., Moya, A., Domingo, E. & Holland, J. J. (1995b). Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *J. Virol.* **69**, 2869-2872.
- Núñez, J. I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Sanchez, C., Domingo, E. & Sobrino, F. (2001). A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol* **75**, 3977-83.
- Núñez, J. I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Sánchez, C., Domingo, E. & Sobrino, F. (2001). A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J. Virol.* **75**, 3977-83.
- O'Donnell, V. K., Pacheco, J. M., Henry, T. M. & Mason, P. W. (2001). Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* **287**, 151-62.
- O'Reilly, E. K. & Kao, C. C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* **252**, 287-303.
- Ohtsu, A., Boku, N., Yoshioka, T., Hyodo, I., Shirao, K., Shimada, Y., Saitoh, S., Nakamura, A., Yamamichi, N., Yamamoto, S. & Yoshida, S. (2003). A Phase II study of irinotecan in combination with 120-h infusion of 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal carcinoma: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9703). *Jpn J Clin Oncol* **33**, 28-32.
- Ojosnegros, S., Agudo, R., Sierra, M., Briones, C., Sierra, S., Gonzalez-Lopez, C., Domingo, E. & Cristina, J. (2008). Topology of evolving, mutagenized viral populations: quasispecies expansion, compression, and operation of negative selection. *BMC Evol Biol* **8**, 207.
- Osheroff, W. P., Beard, W. A., Wilson, S. H. & Kunkel, T. A. (1999). Base substitution specificity of DNA polymerase beta depends on interactions in the DNA minor groove. *J Biol Chem* **274**, 20749-52.
- Page, T. & Connor, J. D. (1990). The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int J Biochem* **22**, 379-83.
- Pariente, N., Airaksinen, A. & Domingo, E. (2003). Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **77**, 7131-8.
- Pariente, N., Sierra, S. & Airaksinen, A. (2005). Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* **107**, 183-193.
- Pariente, N., Sierra, S., Lowenstein, P. R. & Domingo, E. (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J. Virol.* **75**, 9723-30.
- Parker, W. B. (2005). Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* **107**, 165-71.
- Parker, W. B. & Cheng, Y. C. (1990). Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol. Ther* **48**, 381-395.
- Parry, N., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., Fry, E., Acharya, R., Logan, D. & Stuart, D. (1990). Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* **347**, 569-572.
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Molina-Arcas, M., Lostao, M. P., Larráyo, I., Martínez-Picado, J. & Casado, F. J. (2005). Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res.* **107**, 141-150.

- Pathak, H. B., Arnold, J. J., Wiegand, P. N., Hargittai, M. R. & Cameron, C. E. (2007). Picornavirus genome replication: assembly and organization of the VPg uridylylation ribonucleoprotein (initiation) complex. *J Biol Chem* **282**, 16202-13.
- Pathak, H. B., Ghosh, S. K., Roberts, A. W., Sharma, S. D., Yoder, J. D., Arnold, J. J., Gohara, D. W., Barton, D. J., Paul, A. V. & Cameron, C. E. (2002). Structure-function relationships of the RNA-dependent RNA polymerase from poliovirus (3Dpol). A surface of the primary oligomerization domain functions in capsid precursor processing and VPg uridylylation. *J Biol Chem* **277**, 31551-62.
- Pathak, H. B., Oh, H. S., Goodfellow, I. G., Arnold, J. J. & Cameron, C. E. (2008). Picornavirus genome replication: roles of precursor proteins and rate-limiting steps in oriI-dependent VPg uridylylation. *J Biol Chem* **283**, 30677-88.
- Patton, J. R. (1993). Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear RNA containing 5-fluorouridine. *Biochemistry* **32**, 8939-44.
- Paul, A. V. (2002). Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, pp. 227-246. Edited by B. L. Semler & E. Wimmer. Washington, DC: ASM Press.
- Paul, A. V., Molla, A. & Wimmer, E. (1994). Studies of a putative amphipathic helix in the N-terminus of poliovirus protein 2C. *Virology* **199**, 188-99.
- Paul, A. V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2003a). Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* **77**, 891-904.
- Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* **74**, 10359-70.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**, 280-4.
- Paul, A. V., Yin, J., Mugavero, J., Rieder, E., Liu, Y. & Wimmer, E. (2003b). A "slide-back" mechanism for the initiation of protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J Biol Chem* **278**, 43951-60.
- Pawlotsky, J. M. (2000). Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* **32**, 889-96.
- Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Neumann, A. U., Pellerin, M., Frainais, P. O. & Dhumeaux, D. (1998). Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* **72**, 2795-2805.
- Peavy, D. L., Powers, C. N. & Knight, V. (1981). Inhibition of murine plaque-forming cell responses in vivo by ribavirin. *J Immunol* **126**, 861-4.
- Peiris, J. S., Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W. K., Yan, W. W., Cheung, M. T., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, D. N., Yung, R. W., Ng, T. K. & Yuen, K. Y. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**, 1319-25.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320-325.
- Pellizzoni, L., Yong, J. & Dreyfuss, G. (2002). Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* **298**, 1775-9.
- Perales, C., Cava, F., Meijer, W. J. & Berenguer, J. (2003). Enhancement of DNA, cDNA synthesis and fidelity at high temperatures by a dimeric single-stranded DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* **31**, 6473-80.
- Perales, C., Mateo, R., Mateu, M. G. & Domingo, E. (2007). Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J Mol Biol* **369**, 985-1000.
- Pereira, H. G. (1977). Subtyping foot-and-mouth disease virus. *Devel. In Biol. Standard* **35**, 167-174.
- Pereira, H. G. (1981). Foot-and-mouth disease virus. In *Virus Diseases of Food animals*, pp. 333-363. Edited by R. P. G. Gibbs. New York: Academic Press.

- Pfeiffer, J. K. & Kirkegaard, K. (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7289-94.
- Pfeiffer, J. K. & Kirkegaard, K. (2005a). Increased fidelity reduces poliovirus fitness under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens* **1**, 102-110.
- Pfeiffer, J. K. & Kirkegaard, K. (2005b). Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J. Virol.* **79**, 2346-55.
- Pfeiffer, J. K. & Kirkegaard, K. (2005c). Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J. Virol.* **79**, 2346-55.
- Pfister, T. & Wimmer, E. (1999a). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* **274**, 6992-7001.
- Pfister, T. & Wimmer, E. (1999b). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* **274**, 6992-7001.
- Piccone, M. E., Rieder, E., Mason, P. W. & Grubman, M. J. (1995). The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J. Virol.* **69**, 5376-82.
- Pincus, S. E., Diamond, D. C., Emini, E. A. & Wimmer, E. (1986). Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. *J. Virol.* **57**, 638-46.
- Pincus, S. E., Rohl, H. & Wimmer, E. (1987). Guanidine-dependent mutants of poliovirus: identification of three classes with different growth requirements. *Virology* **157**, 83-8.
- Pincus, S. E. & Wimmer, E. (1986). Production of guanidine-resistant and -dependent poliovirus mutants from cloned cDNA: mutations in polypeptide 2C are directly responsible for altered guanidine sensitivity. *J. Virol.* **60**, 793-796.
- Pleij, C. W., Rietveld, K. & Bosch, L. (1985). A new principle of RNA folding based on pseudoknotting. *Nucleic Acids Res* **13**, 1717-31.
- Pringle, C. R. (1970). Genetic characteristics of conditional lethal mutants of vesicular stomatitis virus induced by 5-fluorouracil, 5-azacytidine, and ethyl methane sulfonate. *J. Virol.* **5**, 559-567.
- Quiñones-Mateu, M. E. & Arts, E. (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* **299**, 83-140.
- Racaniello, V. R. (2001). *Picornaviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology*, pp. 685-722. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Randerath, K., Tseng, W. C., Harris, J. S. & Lu, L. J. (1983). Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the 5 position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids. *Recent Results Cancer Res* **84**, 283-97.
- Rankin, J. T., Jr., Eppes, S. B., Antczak, J. B. & Joklik, W. K. (1989). Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus. *Virology* **168**, 147-58.
- Raychaudhuri, G., Govindarajan, S., Shapiro, M., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (1998). Utilization of chimeras between human (HM-175) and simian (AGM-27) strains of hepatitis A virus to study the molecular basis of virulence. *J. Virol.* **72**, 7467-75.
- Rezende, L. F. & Prasad, V. R. (2004). Nucleoside-analog resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1716-34.
- Richman, D. D. (1994). Resistance, drug failure, and disease progression. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **10**, 901-5.
- Roberts, P. J. & Belsham, G. J. (1995). Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease. *Virology* **213**, 140-6.
- Rodriguez, M., McCormick, J. B. & Weissenbacher, M. C. (1986). Antiviral effect of ribavirin on Junin virus replication in vitro. *Rev Argent Microbiol* **18**, 69-74.

- Rodriguez, P. L. & Carrasco, L. (1993). Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J Biol Chem* **268**, 8105-10.
- Rodriguez, P. L. & Carrasco, L. (1995). Poliovirus protein 2C contains two regions involved in RNA binding activity. *J Biol Chem* **270**, 10105-12.
- Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**, 601.
- Rowlands, D. J. (1999). Foot-and-mouth disease virus (Picornaviridae). In *Encyclopedia of Virology*. Edited by A. Granoff & R. G. Webster. London: Academic Press.
- Rowlands, D. J., Ed. (2003). Foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **91**, 1-161.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Arias, A., Baranowski, E., Escarmís, C. & Domingo, E. (2000). Memory in viral quasispecies. *J. Virol.* **74**, 3543-3547.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Ly, C., Domingo, E. & de la Torre, J. C. (2003). Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* **308**, 37-47.
- Rutman, R. J., Cantarow, A. & Paschkis, K. E. (1954). Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. I. The intracellular distribution of nucleic acids and protein in rat liver. *Cancer Res* **14**, 111-4.
- Ryan, M. D. & Flint, M. (1997). Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol* **78** (Pt 4), 699-723.
- Sahasrabudhe, P. V. & Gmeiner, W. H. (1997). Solution structures of 5-fluorouracil-substituted RNA duplexes containing G-U wobble base pairs. *Biochemistry* **36**, 5981-91.
- Sahasrabudhe, P. V., Pon, R. T. & Gmeiner, W. H. (1995). Effects of site-specific substitution of 5-fluorouridine on the stabilities of duplex DNA and RNA. *Nucleic Acids Res* **23**, 3916-21.
- Sahasrabudhe, P. V., Pon, R. T. & Gmeiner, W. H. (1996). Solution structures of 5-fluorouracil-substituted DNA and RNA decamer duplexes. *Biochemistry* **35**, 13597-608.
- Saiz, M., Gomez, S., Martinez-Salas, E. & Sobrino, F. (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**, 93-101.
- Salt, J. (2004). Persistence of foot-and-mouth disease virus. In *Foot-and-mouth disease: current perspectives*, pp. 103-145. Edited by F. Sobrino & E. Domingo. Wymondham, England: Horizon Bioscience.
- Salt, J. S. (1993). The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J* **149**, 207-223.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuelsson, T. (1991). Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases with RNAs substituted with fluorouracil. *Nucleic Acids Res* **19**, 6139-44.
- Samuilova, O., Krogerus, C., Fabrichniy, I. & Hyypia, T. (2006). ATP hydrolysis and AMP kinase activities of nonstructural protein 2C of human parechovirus 1. *J Virol* **80**, 1053-8.
- Santi, D. V. & Hardy, L. W. (1987). Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-)methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* **26**, 8599-606.
- Santi, D. V., McHenry, C. S. & Sommer, H. (1974). Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* **13**, 471-81.
- Sanz-Ramos, M., Diaz-San Segundo, F., Escarmis, C., Domingo, E. & Sevilla, N. (2008). Hidden virulence determinants in a viral quasispecies in vivo. *J Virol* **82**, 10465-76.
- Saunders, K. & King, A. M. (1982). Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. *J. Virol.* **42**, 389-94.
- Saunders, K., King, A. M., McCahon, D., Newman, J. W., Slade, W. R. & Forss, S. (1985). Recombination and oligonucleotide analysis of guanidine-resistant foot- and-mouth disease virus mutants. *J. Virol.* **56**, 921-9.
- Scheidel, L. M., Durbin, R. K. & Stollar, V. (1987). Sindbis virus mutants resistant to mycophenolic acid and ribavirin. *Virology* **158**, 1-7.
- Scheidel, L. M. & Stollar, V. (1991). Mutations that confer resistance to mycophenolic acid and ribavirin on Sindbis virus map to the nonstructural protein nsP1. *Virology* **181**, 490-9.

- Schinkel, J., de Jong, M. D., Bruning, B., van Hoek, B., Spaan, W. J. & Kroes, A. C. (2003). The potentiating effect of ribavirin on interferon in the treatment of hepatitis C: lack of evidence for ribavirin-induced viral mutagenesis. *Antivir Ther* **8**, 535-40.
- Schuster, P. & Stadler, P. F. (1999). Nature and evolution of early replicons. In *Origin and Evolution of Viruses*, pp. 1-24. Edited by E. Domingo, R. G. Webster & J. J. Holland. San Diego: Academic Press.
- Semler, B. L. & Wimmer, E. (2002). Molecular Biology of Picornaviruses. Washington, D.C.: ASM Press.
- Serrano, P., Pulido, M. R., Saiz, M. & Martinez-Salas, E. (2006). The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol* **87**, 3013-22.
- Severson, W. E., Schmaljohn, C. S., Javadian, A. & Jonsson, C. B. (2003). Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J. Virol.* **77**, 481-8.
- Sevilla, N., Kunz, S., Holz, A., Lewicki, H., Homann, D., Yamada, H., Campbell, K. P., de La Torre, J. C. & Oldstone, M. B. (2000). Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1249-60.
- Sevilla, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Gomez-Mariano, G., Baranowski, E. & Domingo, E. (1998). An RNA virus can adapt to the multiplicity of infection. *J Gen Virol* **79** (Pt 12), 2971-80.
- Shen, M., Reitman, Z. J., Zhao, Y., Moustafa, I., Wang, Q., Arnold, J. J., Pathak, H. B. & Cameron, C. E. (2008). Picornavirus genome replication. Identification of the surface of the poliovirus (PV) 3C dimer that interacts with PV 3Dpol during VPg uridylation and construction of a structural model for the PV 3C2-3Dpol complex. *J Biol Chem* **283**, 875-88.
- Shen, M., Wang, Q., Yang, Y., Pathak, H. B., Arnold, J. J., Castro, C., Lemon, S. M. & Cameron, C. E. (2007). Human rhinovirus type 14 gain-of-function mutants for oriI utilization define residues of 3C(D) and 3Dpol that contribute to assembly and stability of the picornavirus VPg uridylation complex. *J Virol* **81**, 12485-95.
- Shigeta, S., Mori, S., Watanabe, J., Soeda, S., Takahashi, K. & Yamase, T. (1997). Synergistic anti-influenza virus A (H1N1) activities of PM-523 (polyoxometalate) and ribavirin in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1423-7.
- Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y. Y., Kaneko, S., Shimotohno, K. & Murakami, S. (2004). Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* **78**, 2738-48.
- Shimizu, H., Agoh, M., Agoh, Y., Yoshida, H., Yoshii, K., Yoneyama, T., Hagiwara, A. & Miyamura, T. (2000). Mutations in the 2C region of poliovirus responsible for altered sensitivity to benzimidazole derivatives. *J Virol* **74**, 4146-54.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K. & Murakami, S. (2002). Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* **277**, 11149-55.
- Showalter, A. K., Byeon, I. J., Su, M. I. & Tsai, M. D. (2001). Solution structure of a viral DNA polymerase X and evidence for a mutagenic function. *Nat Struct Biol* **8**, 942-6.
- Sidwell, R. W., Huffman, J. H., Khare, G. P., Allen, L. B., Witkowski, J. T. & Robins, R. K. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* **177**, 705-6.
- Sierra, M. (2007). Bases moleculares de la resistencia a ribavirina en el virus de la fiebre aftosa. Implicaciones para la mutagénesis letal de virus. Tesis Doctoral. Madrid (Spain): Universidad Autónoma de Madrid.
- Sierra, M., Airaksinen, A., Gonzalez-Lopez, C., Agudo, R., Arias, A. & Domingo, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol* **81**, 2012-24.
- Sierra, S. (2001). Caracterización de la respuesta del virus de la fiebre aftosa a mutagénesis química. Madrid (Spain): Universidad Autónoma de Madrid.

- Sierra, S., Davila, M., Lowenstein, P. R. & Domingo, E. (2000). Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J Virol* **74**, 8316-23.
- Simmons, A., Whitehead, R. P., Kolokoltsov, A. A. & Davey, R. A. (2006). Use of recombinant lentivirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein G for efficient generation of human anti-cancer chimeric T cells by transduction of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Virol J* **3**, 8.
- Sintchak, M. D. & Nimmesgern, E. (2000). The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* **47**, 163-84.
- Smee, D. F., Bray, M. & Huggins, J. W. (2001). Antiviral activity and mode of action studies of ribavirin and mycophenolic acid against orthopoxviruses in vitro. *Antivir Chem Chemother* **12**, 327-35.
- Smee, D. F., Morris, J. L., Barnard, D. L. & Van Aerschot, A. (1992). Selective inhibition of arthropod-borne and arenaviruses in vitro by 3'-fluoro-3'-deoxyadenosine. *Antiviral Res* **18**, 151-62.
- Sobrinho, F., Davila, M., Ortin, J. & Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**, 310-8.
- Sobrinho, F. & Domingo, E. (2004). Foot-and-Mouth Disease: Current Perspectives. Horizon Bioscience. Wymondham, England.
- Sobrinho, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M. A., Núñez, J. I., Rosas, M. F., Baranowski, E. & Ley, V. (2001). Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* **32**, 1-30.
- Sommer, H. & Santi, D. V. (1974). Purification and amino acid analysis of an active site peptide from thymidylate synthetase containing covalently bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and methylenetetrahydrofolate. *Biochem Biophys Res Commun* **57**, 689-95.
- Sowers, L. C., Eritja, R., Kaplan, B., Goodman, M. F. & Fazakerly, G. V. (1988). Equilibrium between a wobble and ionized base pair formed between fluorouracil and guanine in DNA as studied by proton and fluorine NMR. *J Biol Chem* **263**, 14794-801.
- Sowers, L. C., Goodman, M. F., Eritja, R., Kaplan, B. & Fazakerley, G. V. (1989). Ionized and wobble base-pairing for bromouracil-guanine in equilibrium under physiological conditions. A nuclear magnetic resonance study on an oligonucleotide containing a bromouracil-guanine base-pair as a function of pH. *J Mol Biol* **205**, 437-47.
- Spector, D. H. & Baltimore, D. (1975). Polyadenylic acid on poliovirus RNA IV. Poly(U) in replicative intermediate and double-stranded RNA. *Virology* **67**, 498-505.
- Staehelin, M. & Gordon, M. P. (1960). Effects of halogenated pyrimidines on the growth of tobacco mosaic virus. *Biochim Biophys Acta* **38**, 307-15.
- Steil, B. P. & Barton, D. J. (2008). Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res.*
- Steil, B. P. & Barton, D. J. (2009). Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res* **139**, 240-52.
- Steinhauer, D. A., Domingo, E. & Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**, 281-288.
- Steitz, T. A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature* **391**, 231-2.
- Steitz, T. A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* **274**, 17395-8.
- Stoker, M. & Macpherson, I. (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature* **203**, 1355-7.
- Streeter, D. G., Witkowski, J. T., Khare, G. P., Sidwell, R. W., Bauer, R. J., Robins, R. K. & Simon, L. N. (1973). Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1174-8.
- Stuyver, L. J., Lostia, S., Patterson, S. E., Clark, J. L., Watanabe, K. A., Otto, M. J. & Pankiewicz, K. W. (2002). Inhibitors of the IMPDH enzyme as potential anti-bovine viral diarrhoea virus agents. *Antivir Chem Chemother* **13**, 345-52.

- Sun, Y., Chung, D. H., Chu, Y. K., Jonsson, C. B. & Parker, W. B. (2007). Activity of ribavirin against Hantaan virus correlates with production of ribavirin-5'-triphosphate, not with inhibition of IMP dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 84-8.
- Sutmoller, P., Barteling, S. S., Olascoaga, R. C. & Sumption, K. J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **91**, 101-44.
- Suzuki, S., Saneyoshi, M., Nakayama, C., Nishiyama, Y. & Yoshida, S. (1985). Mechanism of selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1-beta-D-arabinofuranosyl-5-fluorouracil. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 326-30.
- Swetina, J. & Schuster, P. (1982). Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication. *Biophys. Chem.* **16**, 329-345.
- Tahirov, T. H., Temiakov, D., Anikin, M., Patlan, V., McAllister, W. T., Vassilyev, D. G. & Yokoyama, S. (2002). Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution. *Nature* **420**, 43-50.
- Takeda, N., Kuhn, R. J., Yang, C. F., Takegami, T. & Wimmer, E. (1986). Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J. Virol.* **60**, 43-53.
- Takhampunya, R., Ubol, S., Houg, H. S., Cameron, C. E. & Padmanabhan, R. (2006). Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *J Gen Virol* **87**, 1947-52.
- Tam, R. C., Pai, B., Bard, J., Lim, C., Averett, D. R., Phan, U. T. & Milovanovic, T. (1999). Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol* **30**, 376-82.
- Tapia, N., Fernandez, G., Parera, M., Gomez-Mariano, G., Clotet, B., Quinones-Mateu, M., Domingo, E. & Martinez, M. A. (2005). Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection. *Virology* **338**, 1-8.
- Teterina, N. L., Bienz, K., Egger, D., Gorbalenya, A. E. & Ehrenfeld, E. (1997a). Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology* **237**, 66-77.
- Teterina, N. L., Egger, D., Bienz, K., Brown, D. M., Semler, B. L. & Ehrenfeld, E. (2001). Requirements for assembly of poliovirus replication complexes and negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **75**, 3841-50.
- Teterina, N. L., Gorbalenya, A. E., Egger, D., Bienz, K. & Ehrenfeld, E. (1997b). Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol* **71**, 8962-72.
- Teterina, N. L., Kean, K. M., Gorbalenya, A. E., Agol, V. I. & Girard, M. (1992). Analysis of the functional significance of amino acid residues in the putative NTP-binding pattern of the poliovirus 2C protein. *J Gen Virol* **73** (Pt 8), 1977-86.
- Teterina, N. L., Levenson, E., Rinaudo, M. S., Egger, D., Bienz, K., Gorbalenya, A. E. & Ehrenfeld, E. (2006). Evidence for functional protein interactions required for poliovirus RNA replication. *J Virol* **80**, 5327-37.
- Thompson, A. A. & Peersen, O. B. (2004). Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Embo J* **23**, 3462-71.
- Tiley, L., King, A. M. & Belsham, G. J. (2003). The foot-and-mouth disease virus cis-acting replication element (cre) can be complemented in trans within infected cells. *J Virol* **77**, 2243-6.
- Toja, M., Escarmis, C. & Domingo, E. (1999). Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* **64**, 161-71.
- Tolskaya, E. A., Romanova, L. I., Kolesnikova, M. S., Gmyl, A. P., Gorbalenya, A. E. & Agol, V. I. (1994). Genetic studies on the poliovirus 2C protein, an NTPase. A plausible mechanism of guanidine effect on the 2C function and evidence for the importance of 2C oligomerization. *J Mol Biol* **236**, 1310-23.
- Toltzis, P., O'Connell, K. & Patterson, J. L. (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 492-7.

- Tu, Z., Chapman, N. M., Hufnagel, G., Tracy, S., Romero, J. R., Barry, W. H., Zhao, L., Currey, K. & Shapiro, B. (1995). The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J. Virol.* **69**, 4607-18.
- Tumpey, T. M., Maines, T. R., Van Hoeven, N., Glaser, L., Solorzano, A., Pappas, C., Cox, N. J., Swayne, D. E., Palese, P., Katz, J. M. & Garcia-Sastre, A. (2007). A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* **315**, 655-9.
- Tyrsted, G. (1982). Effect of hydroxyurea and 5-fluorodeoxyuridine on deoxyribonucleoside triphosphate pools early in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **31**, 3107-13.
- van Bekkum, J. G., Frenke, H. S., Frederiks, H. H. J. & Frenkel, S. (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneesk.* **84**, 1159-1164.
- van Kuppeveld, F. J., Melchers, W. J., Kirkegaard, K. & Doedens, J. R. (1997). Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology* **227**, 111-8.
- van Ooij, M. J., Vogt, D. A., Paul, A., Castro, C., Kuijpers, J., van Kuppeveld, F. J., Cameron, C. E., Wimmer, E., Andino, R. & Melchers, W. J. (2006). Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 CRE(2C): role of CRE(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. *J Gen Virol* **87**, 103-13.
- van Tiel, F. H., Harmsen, M., Kraaijeveld, C. A. & Snippe, H. (1986). Inhibition of Semliki Forest virus multiplication by ribavirin: a potential method for the monitoring of antiviral agents in serum. *J Virol Methods* **14**, 119-25.
- Vance, L. M., Moscufo, N., Chow, M. & Heinz, B. A. (1997). Poliovirus 2C region functions during encapsidation of viral RNA. *J Virol* **71**, 8759-65.
- Verlinden, Y., Cuconati, A., Wimmer, E. & Rombaut, B. (2000). The antiviral compound 5-(3,4-dichlorophenyl) methylhydantoin inhibits the post-synthetic cleavages and the assembly of poliovirus in a cell-free system. *Antiviral Res* **48**, 61-9.
- Vignuzzi, M., Stone, J. K. & Andino, R. (2005). Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res.* **107**, 173-81.
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**, 344-348.
- Vo, N. V., Young, K. C. & Lai, M. M. C. (2003). Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* **42**, 10462-71.
- Volckaert, G. & Fiers, W. (1977). Micro thin-layer techniques for rapid sequence analysis of ³²P-labeled RNA: double digestion and pancreatic ribonuclease analyses. *Anal. Biochem.* **83**, 228-39.
- Volkenstein, M. V. (1994). Physical approaches to biological evolution. Berlin: Springer-Verlag.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-51.
- Wang, H. C. & Hickey, D. A. (2002). Evidence for strong selective constraint acting on the nucleotide composition of 16S ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* **30**, 2501-7.
- Wang, W., Manna, D. & Simmons, D. T. (2007). Role of the hydrophilic channels of simian virus 40 T-antigen helicase in DNA replication. *J Virol* **81**, 4510-9.
- Watts, D. M., Ussery, M. A., Nash, D. & Peters, C. J. (1989). Inhibition of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral infectivity yields in vitro by ribavirin. *Am J Trop Med Hyg* **41**, 581-5.
- Weaver, S. C., Hagenbaugh, A., Bellew, L. A., Gousset, L., Mallampalli, V., Holland, J. J. & Scott, T. W. (1994). Evolution of alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex. *J. Virol.* **68**, 158-69.
- Webster, R. G. (1999). Antigenic variation in influenza viruses. In *Origin and Evolution of Viruses*, pp. 377-390. Edited by E. Domingo, R. G. Webster & J. J. Holland. San Diego: Academic Press.

- Webster, R. G., Laver, W. G., Air, G. M. & Schild, G. C. (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* **296**, 115-21.
- Wildner, O., Hoffmann, D., Jogler, C. & Uberla, K. (2003). Comparison of HSV-1 thymidine kinase-dependent and -independent inhibition of replication-competent adenoviral vectors by a panel of drugs. *Cancer Gene Ther* **10**, 791-802.
- Wilke, H., Stahl, M., Koster, W. & Vanhofer, U. (2000). [Infusiontherapy with 5-fluorouracil ("infusional" 5-FU) in solid tumors]. *Med Klin (Munich)* **95 Suppl 1**, 3-8.
- Willis, R. C., Carson, D. A. & Seegmiller, J. E. (1978). Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3042-4.
- Willis, S. H., Kazmierczak, K. M., Carter, R. H. & Rothman-Denes, L. B. (2002). N4 RNA polymerase II, a heterodimeric RNA polymerase with homology to the single-subunit family of RNA polymerases. *J Bacteriol* **184**, 4952-61.
- Wimmer, E., Hellen, C. U. & Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 353-436.
- Wittmann, H. G. & Wittmann-Liebold, B. (1966). Protein chemical studies of two RNA viruses and their mutants. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 163-72.
- Witwer, C., Rauscher, S., Hofacker, I. L. & Stadler, P. F. (2001). Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res* **29**, 5079-89.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Diver, W. P., Graham, M., Bateman, C., Baker, D. J. & Smith, S. S. (1988). RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **16**, 4465-82.
- Woychik, N. A. & Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**, 453-63.
- Wray, S. K., Gilbert, B. E. & Knight, V. (1985a). Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Res* **5**, 39-48.
- Wray, S. K., Gilbert, B. E., Noall, M. W. & Knight, V. (1985b). Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. *Antiviral Res* **5**, 29-37.
- Wray, S. K., Smith, R. H., Gilbert, B. E. & Knight, V. (1986). Effects of selenazofurin and ribavirin and their 5'-triphosphates on replicative functions of influenza A and B viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **29**, 67-72.
- Wu, X. P. & Dolnick, B. J. (1993). 5-Fluorouracil alters dihydrofolate reductase pre-mRNA splicing as determined by quantitative polymerase chain reaction. *Mol Pharmacol* **44**, 22-9.
- Wyde, P. R., Chetty, S. N., Jewell, A. M., Boivin, G. & Piedra, P. A. (2003). Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* **60**, 51-9.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K. & Wimmer, E. (1998). Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3D pol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J. Virol.* **72**, 6732-6741.
- Xu, X., Liu, Y., Weiss, S., Arnold, E., Sarafianos, S. G. & Ding, J. (2003). Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res* **31**, 7117-30.
- Yin, J., Liu, Y., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2007). Complete protein linkage map between the P2 and P3 non-structural proteins of poliovirus. *J Gen Virol* **88**, 2259-67.
- Yin, J., Paul, A. V., Wimmer, E. & Rieder, E. (2003). Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol* **77**, 5152-66.
- Young, K. C., Lindsay, K. L., Lee, K. J., Liu, W. C., He, J. W., Milstein, S. L. & Lai, M. M. (2003). Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* **38**, 869-878.

- Yu, H., Eritja, R., Bloom, L. B. & Goodman, M. F. (1993). Ionization of bromouracil and fluorouracil stimulates base mispairing frequencies with guanine. *J. Biol. Chem.* **268**, 15935-15943.
- Yuste, E., Sanchez-Palomino, S., Casado, C., Domingo, E. & Lopez-Galindez, C. (1999). Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J Virol* **73**, 2745-51.
- Zhong, X., Garg, P., Stith, C. M., Nick McElhinny, S. A., Kissling, G. E., Burgers, P. M. & Kunkel, T. A. (2006). The fidelity of DNA synthesis by yeast DNA polymerase zeta alone and with accessory proteins. *Nucleic Acids Res* **34**, 4731-42.
- Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B. M., Malcolm, B. A. & Reyes, G. R. (2003). The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* **310**, 333-42.
- Zimmerman, T. P. & Deeproose, R. D. (1978). Metabolism of 5-amino-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem Pharmacol* **27**, 709-16.

9. Anexo

9 Anexo

Tabla A.1 Cambios de nucleótido y aminoácido de MARLS con respecto a C-S8c1

REGIÓN ^a	CAMBIO DE NUCLEÓTIDO ^b	CAMBIO DE AMINOÁCIDO ^c
Fragmento-S	C247U	*
5'UTR	C338U U518C	* *
Proteasa-L	G1091U C1105U A1532G	R-18-I P-23-S E-165G
VP4		
VP2	G2285A	G-130-D
VP3	U2622C C2624U C2826U G3067A U3082A C3202A	= A-25-V = E-173-K C-178-S Q-218-K
VP1	A3328G C3423U U3638C A3797G C3808A	K-41-E = L-144-S H-197-R P-200-Q
2B	A4036G	T-52-A
2C	G4583A A5110G G5133C A5191G	S-80-N T-256-A Q-263-H M283-V
3A	A5364C	=
3B1		
3B2		
3B3		
3C		
3D	U6744C A7305C G7554U U7564C U7932C	= Q-232-H = = =
3'UTR		

^a Región genómica de VFA en la que se produce la mutación (apartado 2.3.2.1 de Introducción).

^b Posición en el genoma del VFA (Escarmís et al., 1999). Se indica la posición y el tipo de nucleótido original en la secuencia de C-S8c1, y el resultante tras la mutación.

^c Cambio de aminoácido producido por la mutación correspondiente. Se indica la posición y el tipo de aminoácido original en la secuencia de C-S8c1, y el resultante tras la mutación. “=” indica que la mutación correspondiente es sinónima. “*” indica un cambio en una región no codificante.

Tabla A.2 Cambios de nucleótido y aminoácido de las distintas poblaciones virales pasadas en presencia de ribavirina con respecto a MARLS

REGIÓN ^a	R-Ap35 ^b	R-Ap45 ^b	R-Ap60 ^b	CAMBIO DE AMINOÁCIDO ^c
Fragmento-S	G242G/A C249U C259U	G242A C249U C259U	G161A G164A G242A C249U C259U	* * * * *
5'UTR	C417U C839C/U C861C/U	C417U C839U C861U	C417U C839U C861U C989U	* * * *
Proteasa-L	A1042A/G G1110G/A G1117A C1146C/U C1206C/U G1476G/A G1573A C1623C/U	A1042G G1110A G1117A C1146U C1206U G1476A G1573A C1623U	A1042G G1110A G1117A C1146U C1206U G1279A G1300A G1476A G1573A C1623U	<u>N2D</u> = <u>G26L</u> = = <u>E81K</u> <u>E88K</u> = <u>V179I</u> =
VP4			G1677A C1806U	= =
VP2	C2487C/U	C2499U	G2073A C2143U G2172A C2196U G2301A C2340U G2470A C2499U	= = = = = = = <u>A192T</u> = =
VP3	C2767C/U C2832C/U	C2619U C2767U C2832U	C2619U C2727U C2767U C2832U C2865U	= = = = =
VP3	C3063C/U G3165A C3195C/U	C3063U G3165A C3195U	C3063U G3126A G3165A C3180U C3195U	= = = = =
VP1 VP1	C3242C/U C3291C/U	C3242U C3291U C3638U	C3242U C3291U C3638U G3657A C3667G G3807A	<u>T12I</u> = <u>S144L</u> = <u>H154D</u> =
2B	C4260C/U	C4260U	C4260U	=

2B	G4272G/A G4308G/A	G4272A G4308A	C4267U G4272A G4308A	= = =
2C	C4620U C4623C/U U4755U/C A4936U	C4620U C4623U U4755C A4936U C5280U	C4620U C4623U C4698U U4755C A4936U C4971U C5070U C5280U	= = = = = = = =
3A	C5526C/A G5557A C5699U	C5526U G5557A C5699U	C5526U G5557A A5569G C5699U	= = = = D87N N91D A134V
3B1	C5807U G5811A C5812U	C5807U G5811A C5812U	C5807U G5811A C5812U	A17V = L19P
3B2			G5856A	=
3C	C6252C/U G6490G/A	C6252U G6490A	C6090U C6144U A6204G C6252U G6490A	= = = = = D160N
3D	C6739C/U A7003A/U G7098G/A C7350C/U C7404C/U G7453G/A G7497A C7506C/A C7548C/U C7935C/U	C6739U G7098A C7374A C7404U G7497A C7506A C7548U C7935U C7947U	C6739U A6741G C6744U C6975U G7098A C7114U C7374A C7404U C7413U U7419C G7497A C7506A C7548U G7554U U7569C C7935U C7947U	P44S = = = = I132V = P169S = = = = = E282K M296I = = = = =
3'UTR		G8043A	G8043A	*

^a Región genómica de VFA en la que se produce la mutación (apartado 2.3.2.1 de Introducción).

^b Cambios de nucleótido observados en cada una de las poblaciones estudiadas. 2 nucleótidos separados por una barra indica mezcla de los 2 nucleótidos en la población, según el cromatograma obtenido en la secuenciación. La numeración de los nucleótidos del genoma del VFA C-S8c1 es según (Escarmís et al., 1999). En negro se muestran las mutaciones completamente impuestas con respecto a la región codificante de 3D de Ap35. En rojo se muestran las mutaciones completamente impuestas con respecto a la región codificante de 3D de R-Ap35. En azul se muestran las

mutaciones completamente impuestas con respecto a la región codificante de 3D de R-Ap45. Las poblaciones virales estudiadas se describen en el apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos y 5.1 de Resultados.

^c Cambios de aminoácido en 3D encontrados en las poblaciones estudiadas. En negrita y subrayado aparecen las substituciones de aminoácido provocadas por las mutaciones completamente impuestas. “=” indica que la mutación correspondiente es sinónima. “*” indica un cambio en una región no codificante.
